



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – IMPLANTODONTIA

NATHALIA PERES JORDÃO PINTO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE
SINVASTATINA ENCAPSULADA POR MICROESFERAS DE
PLGA**

FLORIANÓPOLIS
2017

Nathalia Peres Jordão Pinto

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE
SINVASTATINA ENCAPSULADA POR MICROESFERAS DE
PLGA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia do
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Odontologia, Área de Concentração de
Implantodontia
Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza
Magini

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Pinto, Nathalia Peres Jordão
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO IN VITRO DE
SINVASTATINA ENCAPSULADA POR MICROESFERAS DE PLGA /
Nathalia Peres Jordão Pinto ; orientador, Ricardo
de Souza Magini, 2017.
114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. PLGA. 3. Sinvastatina. 4.
Microesferas. 5. Sistema de liberação de fármaco. I.
Magini, Ricardo de Souza. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. III. Título.

Nathalia Peres Jordão Pinto

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE
SINVASTATINA ENCAPSULADA POR MICROESFERAS DE
PLGA**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia, área de concentração Implantodontia, e
aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em
Odontologia

Florianópolis, 22 de maio de 2017.

Prof.^a Dr.^a Elena Riet Correa Rivero
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Presidente da Banca Examinadora (Orientador)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Águedo Aragonés

Prof.^a Dr.^a Giovana Cristina Bazzo
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais, por
todo apoio e amor que viabilizaram
minha jornada no Mestrado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, por sempre me guiar nas escolhas da vida, pelos dons recebidos e por colocar pessoas especiais no meu caminho, tornando as dificuldades mais leves e me fazendo ser grata por cada oportunidade.

Aos meus pais, **Márcia e Humberto**, não existem palavras para expressar a imensa gratidão por tudo que se esforçam para me proporcionar, além de serem os principais mestres da minha vida e me ensinarem a lição mais valiosa: amar a Deus sobre todas as coisas. O legado de vocês na minha vida é o bem mais precioso do meu ser.

Aos meus amados irmãos, **Raphael e Livia**, obrigada pelo amor e amizade de vocês, que mesmo à distância se fazem presentes na minha vida. Sou grata por cada vez que abdicaram de suas vontades em detrimento do meu estudo, sem nunca deixarem de me incentivar a seguir em frente.

Agradeço aos demais familiares, principalmente à minha madrinha, **Cleide**, por ser minha segunda mãe e amiga, além de seu apoio e incentivo em todas as minhas escolhas.

Ao **Prof. Dr. Marcos Motta**, por ser um exemplo de profissional e amigo, por sempre acreditar no meu potencial e me incentivar a ser melhor.

À **Universidade Federal de Santa Catarina** e ao **Programa de Pós-Graduação de Odontologia**, na figura da coordenadora **Prof.^a Dr.^a Elena Riet Correa Rivero**, pelo acolhimento e privilégio de aprendizado nesta escola.

Ao **Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID)**, minha segunda casa em Florianópolis, onde pude aprimorar meus conhecimentos clínicos e teóricos na profissão.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, por me guiar na vida acadêmica, me ensinar a seguir o coração mesmo na área profissional e ser um exemplo de como um mestre deve ser: humano. Serei sempre grata pelo carinho, pela amizade e toda confiança depositada na minha pessoa.

Ao **Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti**, por se doar inteiramente ao CEPID e fazer com que seja um dos melhores programas de ensino na área, seu esforço e dedicação à nossa profissão é inspirador.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso**, por apurar meu senso crítico e de responsabilidade perante ao curso e as escolhas da vida, por sua postura contestadora, pelo exemplo de vida como professor e clínico.

Ao **Dr. Águedo Aragones**, membro desta banca, pela sua grande contribuição intelectual e todo o esforço para a elaboração desta pesquisa, pela disposição em ajudar a qualquer momento, demonstrando sua amizade e comprometimento.

À **Prof.^a Dr.^a Giovana Carolina Bazzo**, membro da banca, obrigada por toda ajuda na condução dessa pesquisa, sem seu esforço e dedicação não seria possível a realização deste trabalho.

À **Prof.^a Dr.^a Ariadne**, por aceitar ser membro da banca e contribuir com seus conhecimentos para a melhor finalização deste trabalho.

À professora **Claudia Ângela Maziero Volpato**, por todo conhecimento compartilhado nos casos clínicos e todo carinho demonstrado.

Aos meus colegas de turma no mestrado. **Maria Elisa Galárraga**, por ser irmã e amiga durante todo o curso e com certeza para a vida toda, obrigada por partilhar comigo as alegrias e tristezas, pela companhia nos momentos de saudade e pela oportunidade em conhecer pessoa tão nobre. **Edwin Ruales**, por ser companheiro em todas horas, pela incansável disposição em ajudar e aprender, pelo carinho e consideração sempre demonstrados, que a distância nunca seja obstáculo para nossa amizade. **Renata Brum**, pelo apoio e ajuda durante o curso, pela parceria na clínica e em casa, pela amizade e todos os momentos partilhados. **Patrícia Pauleto**, por sempre estar disposta a me ouvir e ajudar em qualquer situação, por todo carinho demonstrado durante esse tempo em que convivemos, obrigada pela sua amizade.

Aos demais colegas da pós-graduação do CEPID, **Karin, Mariane, Adriana, Miguel, Gabriel, Patrícia Medeiros, Camilo, Débora, Bruna, Carolina Morsch, Caroline Rafael, Bernardo, Abraão, Letícia, Gabriela, Madalena, Artur, Joaquim, Javier, Suzéli, Nicolas e Rafael**. Obrigada pela parceria e pela troca de conhecimento durante o tempo que estive com vocês.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia pela atenção e eficiência em nos servir. Agradeço em especial a funcionária **Silvane Costa**, por não medir esforços para que o CEPID funcione da melhor maneira, sempre disposta a nos atender, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal.

Aos demais professores do Departamento de Odontologia, bem como alunos da graduação e funcionários, muito obrigada por fazerem parte da minha trajetória.

De Deus nós sabemos que existe, que é causa de todos os seres e que é infinitamente superior a tudo. Isto é a conclusão e o ponto culminante do nosso saber nesta vida terrena.
(Tomás de Aquino)

RESUMO

Este estudo teve por objetivo sintetizar e caracterizar microesferas de PLGA contendo sinvastatina (SIN), determinar a quantidade de fármaco encapsulado e avaliar a sua liberação *in vitro* para obtenção de um novo biomaterial a ser utilizado na regeneração óssea, composto por micropartículas livres sem a incorporação em arcabouços. As microesferas com SIN foram sintetizadas através do método de simples emulsão e evaporação do solvente, na proporção 1:10 de fármaco e polímero. A morfologia das microesferas foi analisada pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). O tamanho das micropartículas foi obtido por difração a laser. A SIN incorporada ao polímero foi caracterizada pela espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). A eficiência de encapsulamento do fármaco foi testada para determinar a quantidade de SIN incorporada às microesferas de PLGA. As amostras foram incubadas em PBS (pH 7,4), a 36°C por 25 dias para determinar *in vitro* a quantidade de SIN liberada. O método de simples emulsão e evaporação do solvente para a fabricação da amostra foi satisfatório na obtenção de microesferas com morfologia homogênea, superfícies lisas e formato esférico regular. O tamanho foi amplamente distribuído, 80% entre 37 e 690 μm , o diâmetro médio foi de 109 μm , aproximadamente. A eficiência de encapsulamento foi de 85,2% (± 3.5) e o espectro de FT-IR confirmou que a SIN foi incorporada com sucesso ao polímero. O estudo *in vitro* demonstrou uma liberação lenta de SIN, atingindo 0,98 mg de fármaco liberado em 25 dias, sem períodos de rápida liberação inicial. Estes resultados sugerem que as microesferas de PLGA com SIN têm potencial para serem usadas como biomaterial para aumento da formação óssea, devido a sua capacidade de fornecer uma liberação controlada e efetiva de SIN.

Palavras-chave: PLGA 1. Sinvastatina 2. Microesferas 3.

ABSTRACT

The aim of this study was to produce and characterize the PLGA microspheres encapsulating simvastatin (SIM), concentration of drug encapsulated, and *in vitro* drug release to obtain a novel biomaterial for bone regeneration, composed of free microspheres without scaffolds. The microspheres of PLGA with SIM were prepared through the O/W emulsion solvent evaporation technique, in a drug polymer ratio of 1:10. The morphology of microspheres was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Microparticle size was determined by laser diffraction. The SIM incorporated to microspheres were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The drug encapsulation efficacy was evaluated to determine the amount of SIM that was successfully loaded into the PLGA microspheres. The sample was incubated in PBS (pH 7,4) at 36°C for 25 days to determine the *in vitro* drug release. The method to prepare microspheres was satisfactory to obtain homogeneous morphology, smooth surfaces and regular spherical shape. The size was widely distributed, 80% was between 37 μm – 690 μm , and medium diameter was approximately 109 μm . The drug encapsulation efficacy was 85,2% (± 3.5) and the FT-IR spectrum confirmed that SIM was successfully loaded into the polymer. *In vitro* study demonstrated a slow release of SIM where 0,98 mg of drug was released in 25 days. These data suggest SIM-loaded PLGA microspheres has potential to be use as a biomaterial for enhancing bone formation, due its capacity to provide effective controlled release of SIM.

Keywords: PLGA 1. Simvastatin 2. Microspheres 3.

LISTA DE FIGURAS

Figuras do Artigo:

Figura 1 – Fotomicrografias das micropartículas obtidas por MEV, em aumentos de (A) 100x, (B) 500x, (C) 850x e (D) 2000x. As setas indicam a presença de aglomeração e certa coalescência em algumas microesferas 105

Figura 2 – Análise da distribuição do tamanho das microesferas. 106

Figura 3 – Espectro de FT-IR da sinvastatina (a), PLGA (b) e das microesferas de PLGA com sinvastatina (c). 107

Figura 4 – Perfil de liberação da SIN no período de 25 dias em PBS. 108

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

~ - Congruente

± - mais ou menos

≥ - Maior ou igual

°C – Graus Celsius

µm – Micrometro(s)

ALP – Fosfatase alcalina (Alkaline Phosphatase)

BMP – Proteína óssea morfogenética (*Bone Morphogenetic Protein*)

BMP2 – Proteína óssea morfogenética 2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*)

CEPID – Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários

DCM – Diclorometano

Et al. – E outros (*Et alii*)

FDA – *Food and Drug Administration*

FT-IR – Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

HA – Hidroxiapatita

HMG-CoA – hidroxi-metilglutaril coenzima A

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

kV – Quilovolt (medida de tensão elétrica)

L – Litro

EE ou LE – Eficiência de encapsulamento (*Loading Efficiency*)

MEV ou SEM – Microscópio eletrônico por varredura (*Scanning Electron Microscopy*)

mg – Miligramas

ml – Mililitros

m/m ou w/w – relação entre massas (*weight/weight*)

nm – Nanômetro

O/W – Oil-in-Water

OP – Osteopontina

OS – Osteocalcina

p.a. – Para análise

PBS – Tampão salina-fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PLGA – Ácido polilático-co-glicólico

PVA – Álcool polivinílico (*Polivinil acetate*)

RANKL – Receptor ativador do ligante NFκβ (*Receptor activator of NFκβ ligand*)

rhBMP2 – Proteína óssea morfogenética recombinante humana 2 (*recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

Runx2 – Fator de transcrição relacionado ao Runt 2

SIN ou SIM – Sinvastatina (*Simvastatin*)

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alfa*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UK – Reino Unido (*United Kingdom*)

USA – Estados Unidos da América (*United States of America*)

UV – Ultravioleta

α -TCP – alfa tricálcio fosfato

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	23
1.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	25
1.2 OBJETIVOS.....	31
1.2.1 Objetivo geral.....	31
1.2.2 Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO II	33
ARTIGO – VERSÃO EM PORTUGUÊS.....	35
ARTICLE – ENGLISH VERSION.....	65
CAPÍTULO III	95
REFERÊNCIAS.....	97
CAPÍTULO IV	107
Figura 1 (A) e (B).....	109
Figura 1 (C) e (D).....	110
Figura 2.....	111
Figura 3 (a) e (b).....	112
Figura 3 (c).....	113
Figura 4.....	114

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A perda de um elemento dentário resulta em alterações dimensionais no osso alveolar, devido ao fato de que parte do osso somente existe pela presença do elemento, assim quando um dente é perdido, uma porção desse osso é reabsorvida e observa-se a atrofia do alvéolo (ARAÚJO & LINDHE, 2005), sendo maior em altura do que em largura (VAN DER WEIJDEN et al., 2009).

A reabilitação oral de pacientes edêntulos com o uso de implantes dentais osseointegráveis pode ser comprometida pela redução do volume ósseo após a extração (SCHROPP et al., 2003), sendo necessários procedimentos de reconstrução óssea para viabilizar seu tratamento (CHIAPASCO et al., 2009) e almejar melhores resultados, tanto do ponto de vista estético quanto funcional. Em uma revisão sistemática, autores concluíram que o uso de materiais como substitutos ósseos no alvéolo pós-extração resulta na menor contração da crista óssea, sem apontar o uso de um material específico (VIGNOLETTI et al., 2012).

O material eleito como padrão ouro para procedimentos de reconstrução óssea é o osso autógeno, retirado do paciente em áreas doadoras intra ou extra orais, as quais podem não conter a quantidade suficiente de osso, além de apresentarem frequentes morbidades e complicações locais (MCALLISTER & HAGHIGHAT, 2007).

Frente as dificuldades encontradas na utilização do osso autógeno, como morbidade ao paciente e quantidade limitada de material, têm sido criadas constantemente alternativas de biomateriais, com características de osteoindução como os fatores de crescimento e células tronco, além de osteocondução como os biomateriais de enxerto ósseo em diversas apresentações (HÄMMERLE & KARRING, 1998; BUSER et al., 2000; CORDEIRO et al., 2008; SAKAI et al., 2010).

O copolímero ácido polilático-co-glicólico (PLGA) é um polímero sintético hidrofóbico biocompatível e atóxico, devido a sua degradação por hidrólise, gera produtos que são absorvidos pelo organismo (MOTTA & DUEK, 2006), além de excelentes propriedades físico-químicas, controle de sua macro e microestrutura e incorporação e liberação de substâncias, fazendo-o um bom material osteocondutor (LANSMAN et al., 2006; GÓMEZ et al., 2006). Sua aplicação clínica tem sido bastante diversificada, na ortopedia como dispositivos de fixação de fratura craniomaxilofacial, arcabouços para crescimento celular, dispositivos de liberação de fármacos e na regeneração óssea guiada dentro da periodontia e implantodontia, especialmente na forma de membranas (MOTTA & DUEK, 2006). Microesferas de PLGA têm sido

amplamente utilizadas como sistemas de dispersão de drogas e em aplicações médicas regenerativas (BAO et al., 2011).

As proteínas ósseas morfogênicas (BMP's) presentes na matriz extracelular são utilizadas atualmente como fatores de crescimento na regeneração óssea, sendo responsáveis pela indução, diferenciação e proliferação osteogênica das células-tronco mesenquimais durante o remodelamento ósseo (ASAHARA et al., 2000; ZHENG et al., 2004; SUGIYAMA et al., 2005; PHILLIPS et al., 2007; JANSEN et al., 2005; CHAPPARD, 2013).

O uso de uma única dose de rhBMP2 exógena em defeitos ósseos grandes, pode não induzir o estímulo adequado à osteoindução (DRAGOO et al., 2003) por ser requerido uma quantidade seis vezes maior que a BMP endógena (SERVICE, 2000), além de ser uma modalidade de tratamento que apresenta alto custo e riscos, dentre eles destacam-se a falta de controle na atuação desses fatores (devido à cinética de liberação complexa), o uso de dosagens não fisiológicas, a duração da expressão dos genes, imunogenicidade e segurança a longo prazo, o que exige cautela na sua utilização (BODEN, 1999; RIOS et al., 2011; CASAGRANDE et al., 2011).

Devido a estas dificuldades no uso das BMP's exógenas, têm-se procurado alternativas com menores riscos e custos, que sejam capazes de estimular a osteoindução, regulando favoravelmente os fatores de crescimento intrínsecos e que possam ser associados a substitutos osteocondutores, sem afetar a efetividade da regeneração óssea. Como alternativa osteoindutora, têm-se estudado e utilizado as estatinas, aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) e com custo reduzido 16.000 vezes frente às rhBMP2, devido sua fácil sintetização (MUNDY et al., 1999).

As estatinas são moléculas menores, estáveis, não susceptíveis à degradação proteolítica. Elas são responsáveis pela diminuição da síntese do colesterol e a sua ampla utilização deve-se à sua capacidade de inibir a hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, envolvida na síntese do colesterol endógeno, o que vai bloquear a conversão do HMG-CoA em mevalonato (ZHANG et al., 1997). São, deste modo, úteis no tratamento da hipercolesterolemia, um fator de risco essencial para o aparecimento de aterosclerose. A sua ação é acompanhada de efeitos cardioprotetores, que afetam quase todo o processo de aterogênese, desde a injúria endotelial inicial até a progressão e reparo das lesões de aterosclerose, além de influenciar a agregação plaquetária e a deposição de trombos (LACOSTE et al., 1995; DUBUC et al., 2004). Outras ações que se pode destacar são a anti-inflamatória e antioxidante (SAKODA et

al., 2006; NAKA et al., 2008), supressão da ativação de linfócitos T (KWAK et al., 2000), estímulo à angiogênese (KUREISHI et al., 2000) e redução dos peptídios amiloides, relacionados ao mal de Alzheimer (FASSBENDER et al., 2001; KOJRO et al., 2001).

A sinvastatina, forma mais estudada das estatinas, pode inibir a reabsorção óssea através da supressão do caminho do mevalonato, bloqueando moléculas essenciais a atividade osteoclástica (STAAL et al., 2003). Entretanto, promove diferenciação osteoblástica e mineralização pela mediação da expressão de diversos fatores de crescimento críticos à regulação da função dos osteoblastos e o aumento na produção de matriz óssea proteica (MAEDA et al., 2003; MAEDA et al., 2004; RUIZ-GASPA et al., 2007). Nas linhas celulares osteoblásticas, estudos *in vitro* encontraram que a sinvastatina eleva o nível de expressão de BMP2 e o fator de crescimento vascular endotelial para acelerar a diferenciação dos osteoblastos, além de elevar a expressão de osteopontina (OP), colágeno tipo I, sialoproteína óssea e osteocalcina (OS), para promover nova formação óssea (NATH et al., 2014).

Mundy et al. em 1999, foram os primeiros a citarem a sinvastatina como estimulador da formação óssea *in vivo*. Quando injetada subcutaneamente na calvária de ratos, houve aumento na largura óssea, além de obterem aumento do volume de osso esponjoso na tíbia quando administrada oralmente. A sinvastatina demonstrou capacidade de aumentar o nível de expressão de BMP's em células ósseas e estimular a formação óssea (MUNDY et al., 1999; SUGIYAMA et al., 2000; OHNAKA et al., 2001; MAEDA et al., 2001; MAEDA et al., 2004; LIU et al., 2009; MACIEL-OLIVEIRA et al., 2011).

As formas de administração da sinvastatina podem variar, geralmente são administradas por via oral e a concentração disponível do fármaco nos tecidos é baixa, sendo uma concentração insuficiente para estimular a formação óssea em defeitos periimplantares (JADHAV et al., 2006; MA et al., 2008). Além disso, a administração sistêmica do fármaco pode resultar em sérios efeitos colaterais ao organismo devido sua degradação hepática (KHEIRALLAH & ALMESHALY, 2016). Quando aplicada em forma de injeções locais, como em fraturas, são ineficientes devido seu baixo peso molecular e consequente difusão acelerada, não sendo aconselhado o uso de injeções repetidas, visto que altas concentrações locais podem ser tóxicas devido à drástica redução na produção de colesterol, importante substância que mantém a integridade das membranas celulares (WHANG et al., 2005).

A aplicação local incorporada a materiais específicos como um meio condutor para controlar a sua liberação e permitir a formação óssea

sem danos aos tecidos tem sido testada em diversos estudos, com diferentes tipos de carreadores, como a gelatina (OZEC et al., 2008), ácido polilático-co-glicólico (WU et al., 2008), nanopartículas adicionadas ao PLGA (HO et al., 2011), sulfato de cálcio (NYAN et al., 2007) e alfa tricálcio fosfato (NYAN et al., 2009), os quais têm demonstrado potencial em aumentar a formação óssea (PARK, 2009). São necessários mais estudos para que exista um consenso sobre qual carreador é mais adequado para a sinvastatina.

Maciel-Oliveira et al. (2011) avaliaram o uso de sinvastatina em gel em defeitos criados no processo alveolar de ratos. Foi observado uma formação óssea mais rápida nos defeitos tratados com sinvastatina, porém houve ausência de osteoclastos nas amostras. Um estudo *in vitro*, mostrou que as estatinas inibiram a reabsorção óssea por meio da supressão da cascata do mevalonato, bloqueando a prenilação de moléculas sinalizadoras essenciais para a atividade osteoclástica (STAAL et al., 2003).

Moon et al. (2011), mostraram que a sinvastatina inibiu a formação de osteoclastos, induzida pela cascata de RANKL, por meio da inibição da sinalização induzida pelas espécies ativas de oxigênio (ROS). A sinvastatina parece também inibir a indução de metaloproteinase-9, relacionada à reabsorção óssea (KIM et al., 2009).

A maior limitação à sua aplicação clínica é o meio apropriado de entrega e liberação. Baixas doses de sinvastatina não têm impacto na formação óssea, enquanto que altas dosagens levam a uma alta citotoxicidade e estimulação do processo inflamatório, atrasando o reparo tecidual. Como demonstrado no estudo *in vivo* feito por Encarnação e colaboradores (2012) que avaliaram o reparo ósseo em defeitos criados na calvária de ratos tratados com sinvastatina incorporada a arcabouços de PLGA+HA e a sinvastatina isolada, ambas na concentração de 4 mg/ml, após 60 dias foi observado atraso no início da formação óssea.

O uso de altas concentrações de sinvastatina ocasionou uma significativa inflamação do tecido mole em diversos estudos (THYLIN et al., 2002; STEIN et al., 2005; NYAN et al., 2007). A sua concentração local e efetividade também depende da liberação pelo carreador (LIMA et al., 2011). Stein et al. (2005) utilizaram 0,1 mg de sinvastatina em gel de metil-celulose e não foi observado qualquer estimulação de formação óssea. Já Nyan et al. (2009) utilizaram a mesma quantidade de sinvastatina, combinada com partículas de substituto ósseo (α -TCP), e reportaram a formação de tecido ósseo, com resultados melhores do que com as dosagens de 0,25 e 0,5 mg de sinvastatina. Quando utilizadas

dosagens superiores a 2,2 mg houve uma exacerbação do processo inflamatório e inibição da formação óssea.

Kheirallah e Almeshaly (2016) em uma revisão da literatura, concluíram que a liberação local da sinvastatina pode aumentar a formação óssea e acelerar o processo de cicatrização de defeitos ósseos e que a estimulação da neoformação óssea é dependente da dose de fármaco utilizada. Sendo assim, são necessários mais estudos baseados em evidências para determinar as concentrações locais necessárias para promover a regeneração óssea.

Em testes realizados *in vitro* foi possível observar que a incorporação de substâncias nos arcabouços de PLGA permite, durante a sua degradação em ácido lático, a liberação de moléculas de sinvastatina por até 6 semanas (WHANG et al., 2005). Wu et al. (2008), administraram localmente uma dose de 1,2 mg de sinvastatina, carregada por PLGA, e observaram que a formação de novo osso foi promovida em reparo de alvéolos em ratos, mantendo a altura residual do rebordo alveolar. Mais estudos demonstraram resultados favoráveis (NYAN et al., 2007; NYAN et al., 2009; OZEC et al., 2008; WU et al., 2008; PARK et al., 2009; HO et al., 2011). Em um estudo realizado por Huang et al. (2014), a utilização de sinvastatina incorporada em arcabouços de sulfato de cálcio apresentou efeitos benéficos na regeneração óssea, semelhantes aos obtidos com rhBMP2, demonstrando, assim, um material com grande potencial para a engenharia tecidual óssea.

Quando utilizada sob a forma de grânulos incorporados numa matriz de celulose polimérica, a sinvastatina promoveu uma maior neovascularização e demonstrou aumentar a osseointegração de implantes imediatos, instalados em cães (MANSOUR et al., 2014).

O PLGA produzido sob o formato de microesferas tem sido amplamente utilizado como sistema carreador de drogas e em aplicações médicas regenerativas, principalmente devido a sua biocompatibilidade e degradação. A sinvastatina encapsulada por microesferas de PLGA são de fácil fabricação quando adquiridas pelo método de simples emulsão/dupla emulsão e evaporação do solvente, apresenta alta eficácia de encapsulamento da droga e sua característica de biodegradação permite uma lenta liberação da droga por até um mês (BAO et al., 2011; NAITO et al., 2014; GENTILE et al., 2016; MASAELI et al., 2016). No estudo *in vitro* de Bao et al. (2011), foi demonstrado que as microesferas com sinvastatina promoveram a agregação e proliferação celular, o que permite o seu uso como carreador na regeneração do tecido ósseo, teoria confirmada pelo estudo *in vivo* de Naito et al. (2014), no qual afirmaram que esse material incorporado a um arcabouço de cimento ósseo

composto de aluminato de cálcio, aumentou a formação óssea em defeitos criados na calvária de ratos.

Existem vários relatos de microesferas de PLGA encapsuladas com sinvastatina e sua efetividade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, na regeneração óssea tecidual quando incorporadas a um arcabouço, de diferentes composições (NANDAGIRI et al., 2012; NATH et al., 2014; ZHANG et al., 2015; GENTILE et al., 2016).

Praticamente não se tem estudos da utilização das microesferas de PLGA com sinvastatina fora de arcabouços de substitutos ósseos. Tai e colaboradores (2013) encapsularam sinvastatina em microesferas de PLGA com hidroxiapatita e concluíram, através de estudo *in vivo*, que essa formulação pode ser usada como agente osteoindutor por terem estimulado a formação de calo ósseo e neovascularização, ou podem ser combinadas com arcabouços osteocondutores para tratamento de defeitos ósseos severos.

Ferreira et al. (2015) utilizaram microesferas (concentração de 2,5% de sinvastatina em relação ao PLGA) para preencher defeitos ósseos criados na calvária de ratos e o recobriram com uma membrana de PLGA. Após 60 dias, os defeitos apresentaram cicatrização óssea quase completa com a presença de matriz óssea organizada e madura, além de mostrar a interação entre o biomaterial e o tecido circundante onde células estabeleceram íntimo contato com as microesferas. O reparo de defeitos ósseos em ratos foi melhor e mais rápido com o uso da sinvastatina encapsulada por microesferas de PLGA.

Terukina e colaboradores (2016) avaliaram a liberação da sinvastatina encapsulada por micro e nanoesferas de PLGA. O estudo *in vitro* demonstrou que a liberação do fármaco foi mais lenta nas microesferas (1 mês) do que nas nanoesferas (1 semana) e que somente as microesferas tiveram efeito na proliferação de células pré-osteoblásticas de linhagem de ratos. No estudo *in vivo*, em defeitos criados na calvária de ratos, ambos materiais promoveram formação óssea, porém o comportamento das microesferas foi superior ao das nanoesferas.

Ainda não existe um consenso sobre o uso das microesferas de PLGA contendo sinvastatina para a regeneração óssea, se esse uso deve ou não estar associado a um arcabouço como agente osteocondutor, visto que o PLGA por si só possui propriedade osteocondutora e é usado como carreador da sinvastatina. Além do que, a aplicação de esferas livre de um arcabouço proporcionaria o uso em defeitos periodontais e periimplantares pequenos, onde não estaria indicado o uso de um arcabouço pela limitação do espaço.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi fabricar microesferas de sinvastatina encapsuladas por PLGA, para a obtenção de um biomaterial substituto ósseo sem a sua incorporação à arcabouços.

1.2.2 Objetivos específicos

- Fabricação de microesferas de PLGA contendo sinvastatina com perfil de liberação lento e controlado.
- Caracterização por FT-IR das principais substâncias empregadas na obtenção das microesferas (PLGA e sinvastatina).
- Caracterização da morfologia (MEV) e distribuição do tamanho (difração à laser) das microesferas.
- Determinação da concentração de sinvastatina encapsulada pelas microesferas de polímero.
- Avaliação da liberação do fármaco em meio fisiológico.

CAPÍTULO II

ARTIGO – VERSÃO EM PORTUGUÊS

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO IN VITRO DE
SINVASTATINA ENCAPSULADA POR MICROESFERAS DE
PLGA**

Este artigo está formatado sob as normas da revista Journal of
Biomedical Materials Research Part A

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E LIBERAÇÃO *IN VITRO* DE SINVASTATINA ENCAPSULADA POR MICROESFERAS DE PLGA

Nathalia PJ Pinto⁽¹⁾, Giovana C Bazzo⁽²⁾, Águedo Aragones⁽³⁾, Cesar AM Benfatti⁽¹⁾, Ricardo S Magini⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID), Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Departamento de Odontologia (ODT), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

⁽²⁾ Ciências e Tecnologia de Alimentos (CTA), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

⁽³⁾ Biocentro, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Autor de correspondência:

Nathalia PJ Pinto, Centro de Ensino e Pesquisa em Implantes Dentários (CEPID), Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Departamento de Odontologia (ODT), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 88040-900, Brasil.

Email: n.jordao@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar microesferas de PLGA contendo sinvastatina (SIN), determinar a concentração de fármaco encapsulado e a liberação *in vitro* para obter um novo biomaterial para regeneração óssea, composto por microesferas livres de arcabouços com perfil de liberação lento e controlado. As microesferas de PLGA com SIN foram preparadas pelo método de simples emulsão e evaporação do solvente. A caracterização foi feita pelo microscópio eletrônico de varredura, difração a laser e pela espectrometria de infravermelho (FT-IR). A eficiência de encapsulamento do fármaco foi avaliada por espectrofotometria UV. As amostras foram incubadas em PBS por 25 dias para determinar a liberação *in vitro* do fármaco. As microesferas mostraram-se homogêneas com superfície lisa e formato esférico regular. O tamanho médio foi de 109 μm . A eficiência de encapsulamento foi de 85,2% ($\pm 3,5$), o espectro do FT-IR confirmou que a SIN foi encapsulada com sucesso no interior do polímero. O estudo *in vitro* demonstrou uma liberação lenta da SIN, atingindo 0,98 mg em 25 dias. Estes resultados sugerem que microesferas carreadoras de sinvastatina têm potencial para serem usadas como biomaterial para aumentar a formação óssea, devido sua capacidade de controlar a liberação da SIN, sem rápida liberação inicial.

Palavras-chave

PLGA; sinvastatina; microesferas; liberação de fármaco; osteogênico.

Título abreviado

Caracterização e liberação de SIN encapsulada por microesferas de PLGA

Introdução

Toda vez que um elemento dentário é perdido ocorrem alterações dimensionais no alvéolo causadas pela reabsorção óssea, tornando-se um limitador da reabilitação com implantes dentais osseointegráveis a partir do momento que a redução do volume ósseo em altura e largura^{1,2} não permita essa modalidade de tratamento, sendo necessários procedimentos de reconstrução óssea no alvéolo pós-extração para diminuir a contração da crista óssea e viabilizar a instalação de implantes, otimizando os resultados estético e funcional.³⁻⁵

O uso do osso autógeno, considerado padrão ouro como enxerto, apresenta certas dificuldades e limitações⁶, o que leva ao estudo de biomateriais alternativos que possuam as características de osteoindução e osteocondução.⁷⁻¹⁰ Dentre esses produtos, encontra-se o ácido polilático-co-glicólico (PLGA), um copolímero sintético, biocompatível, com excelentes propriedades físico-químicas, sendo um bom material osteocondutor.¹¹⁻¹³ O PLGA tem aplicação clínica diversificada, seja na medicina, farmacologia e na odontologia, onde tem sido mais usado como arcabouço de enxerto ósseo e membranas. O uso de microesferas de PLGA tem sido reportado como sistemas de dispersão de drogas e em procedimentos regenerativos.¹⁴

O uso das proteínas morfogenéticas recombinantes exógenas (rhBMP2) como fatores de crescimento na regeneração óssea se apresenta como uma alternativa de tratamento de custo e risco elevados¹⁵⁻¹⁸, o que levou a busca por opções capazes de estimularem a osteoindução, como o uso das estatinas, tão comumente utilizadas para a diminuição do colesterol, dentre elas, destaca-se a sinvastatina.¹⁹ Esta substância promove diferenciação osteoblástica por elevar o nível de expressão de proteínas morfogenéticas 2 (BMP2), osteopontina (OP), colágeno tipo I, sialoproteína e osteocalcina (OS), para promover nova formação óssea.²⁰⁻²⁴ Além disso, pela indução da diferenciação dos osteoblastos, a sinvastatina antagoniza a ativação da proteína quinase pelo fator de necrose tumoral alpha (TNF α), o que reverte seu efeito supressor e previne a inibição de BMP2, permitindo o processo osteogênico, devido a ativação da cascata de BMP e, consequente expressão dos marcadores osteogênicos como Runx2, OS e fosfatase alcalina.²⁵⁻²⁷

A sinvastatina foi utilizada *in vivo* pela primeira vez em 1999 e demonstrou a capacidade de estimular a formação óssea, porém sua forma de administração e dosagem alteram os resultados, podendo ser tóxica aos tecidos ou não estar em concentrações suficientes nos tecidos.²⁸⁻³⁰ O uso da sinvastatina associada a materiais condutores que controlem sua liberação tem sido testados em diversos estudos, sendo o PLGA um destes

materiais.^{31,32} As microesferas de PLGA contendo sinvastatina têm demonstrado eficácia na liberação da droga para que não seja tóxica, além de promover a agregação e proliferação celular no tecido ósseo, porém é escassa a utilização dessa forma de apresentação do material sem a sua incorporação à arcabouços.³³

Mais estudos *in vitro* e *in vivo* precisam ser feitos para o desenvolvimento de um novo biomaterial de enxerto ósseo, com propriedades de osteoindução e osteocondução, usando a sinvastatina incorporada às microesferas de PLGA, que tenha viabilidade para o uso em humanos. O aspecto mais importante para se alcançar uma liberação da sinvastatina mais lenta e controlada é o perfil de liberação do fármaco. Assim, o propósito deste estudo foi produzir microesferas de PLGA contendo sinvastatina que tenha um perfil de liberação lento, sem um período de rápida liberação inicial.

Materiais e Métodos

Materiais

PLGA Resomer LG 824 S (82L:18G) foi adquirido da Evonik Boehringer Ind. Pharma GmbH & Co., Alemanha. Sinvastatina ($\geq 98\%$ HPLC) foi obtida da Merck, Alemanha. Álcool polivinílico (PVA) foi adquirido da Sigma-Aldrich, Canadá. Tampão salina-fosfato (PBS – 9,88 g/L, pH 7,4)

foi comprado da Kasvi, Brasil. Diclorometano p.a. (99,9% HPLC) foi obtido da Vetec, Brasil.

Fabricação das microesferas de PLGA contendo sinvastatina

As microesferas de PLGA com SIN foram produzidas pelo método de simples emulsão e evaporação do solvente (O/W). Inicialmente, 500 mg de PLGA foram dissolvidos em 20 ml de diclorometano (DCM) numa concentração de 2,5% m/v, até sua total dissolução, então 50 mg de SIN foi adicionada à solução para obtenção da relação de 10% m/m entre fármaco e polímero (fase interna). A solução obtida foi gotejada lentamente em 400 ml de PVA a 1% (fase contínua), sob agitação vigorosa em agitador magnético em temperatura ambiente. Para completa evaporação do solvente, a mistura foi mantida sob agitação constante por uma noite. As amostras foram coletadas por decantação, lavadas três vezes com água, secas e armazenadas em temperatura ambiente.

Morfologia e tamanho das microesferas

A amostra foi montada em blocos de alumínio, sobre fita de carbono dupla-face, recobertas com ouro e então, sua morfologia foi analisada por microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV, USA), a 10 kV. O tamanho das micropartículas foi determinado por difração a laser (Mastersizer 2000, Malvern Instrument Ltd., UK).

Caracterização por FT-IR

A SIN, o PLGA e a SIN incorporada às microesferas foram caracterizadas por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR Spectrometer Cary 600 Series, Agilent Technologies, USA).

Eficiência de encapsulamento e estudo de liberação *in vitro*

A eficiência de encapsulamento foi avaliada para determinar a quantidade de SIN que foi encapsulada com sucesso pelas microesferas de PLGA. Uma quantidade de micropartículas (50 mg) equivalente a 5 mg de SIN foi precisamente pesada e então, dissolvida e diluída em diclorometano para alcançar uma concentração de fármaco de 10 mg/L. A solução foi analisada em espectrofotômetro UV (SP 2000 UV, Bel Photonics, Itália) em comprimento de onda de 240 nm. A concentração de SIN presente nas micropartículas foi obtida através de uma curva de calibração. O experimento foi feito em duplicata. A eficiência de encapsulamento foi obtida usando a Equação³⁴: $EE\% = \frac{\text{fármaco encontrado nas micropartículas (mg)}}{\text{fármaco inicialmente adicionado à formulação (mg)}} \times 100$.

Para obter a curva de liberação do fármaco, as microesferas foram pesadas (15,3 mg de microesferas contendo 0,6 mg de SIN) e incubadas em 60 ml de PBS (pH 7,4), por 25 dias em banho maria à 36°C. Em intervalos de tempo específicos, 3 ml das soluções preparadas da amostra foram

coletadas e devolvidas aos recipientes após a leitura das absorbâncias. A absorbância foi detectada usando o mesmo espectrofotômetro UV a 240 nm. Foi usada uma curva padrão de calibração com concentrações conhecidas de SIN em acetronitrilo para quantificar a SIN liberada pelas microesferas. O teste foi realizado em triplicata.

Resultados

Morfologia e tamanho das microesferas

As imagens do MEV das microesferas são apresentadas na Fig. 1. É evidente que a morfologia das microesferas é homogênea com superfície lisa e formato esférico regular. A análise por difração à laser demonstrou que 80% encontra-se entre 37 μm a 690 μm , aproximadamente, e que o tamanho médio foi $\sim 109 \mu\text{m}$ (Fig. 2).

Caracterização por FT-IR

Pelo espectro do FT-IR do PLGA (Fig. 3(b)), estiramento de vibrações de $-\text{OH}$ ($3200\text{-}3500 \text{ cm}^{-1}$), estiramentos de $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ ($2900\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$), banda de absorção do grupo carbonila $\text{C}=\text{O}$ (1750 cm^{-1}), estiramento de $\text{C}-\text{O}$ ($1000\text{-}1250 \text{ cm}^{-1}$) foram observados e caracterizam o copolímero. O espectro da SIN (Fig. 3(a)) mostra uma ampla banda em $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ relacionada ao estiramento de vibração de $\text{O}-\text{H}$ livre, estiramento de vibração de $\text{C}-\text{H}$ (3011 , 2959 e 2972 cm^{-1}) e estiramento

de vibração de C=O dos grupos funcionais éster e lactona (1714 cm^{-1}). O espectro das microesferas (Fig. 3(c)) mostrou picos em $\sim 3,500\text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1,700\text{ cm}^{-1}$, confirmando que a SIN foi incorporada ao PLGA com sucesso.

Eficiência de encapsulamento e estudo de liberação *in vitro*

O teste de eficiência de encapsulamento revelou que $85,2 \pm 3,5\%$ de SIN foi incorporada nas microesferas de PLGA, na relação de 1:10 entre fármaco e polímero. O perfil de liberação da SIN (Fig. 4) das microesferas de PLGA demonstrou uma liberação controlada e lenta durante os 25 dias, onde quase 5% foi liberado. Indicando que 0,98 mg/l de SIN foi liberada no período do teste. Subsequentemente, a média de fármaco liberado foi de aproximadamente 0,039 mg/dia.

Discussão

As propriedades físico-químicas de microesferas carreadoras de drogas feitas com polímero podem variar de acordo com muitos fatores envolvidos na escolha dos materiais e suas concentrações, do método de produção, incluindo cada etapa do processo de fabricação da amostra.³⁵ Neste estudo, para obtenção de uma liberação lenta e controlada da droga, foi escolhido o método de simples emulsão e evaporação do solvente (O/W), por ser considerado uma das técnicas mais simples para o

microencapsulamento de drogas hidrofóbicas, como é o caso da sinvastatina aqui utilizada.³⁶

O tamanho encontrado das partículas teve uma grande variação (20 µm a 700 µm), que pode ser explicado por não ter sido usado nenhum filtro/peneira para limitar o tamanho das mesmas. Sendo possível verificar essa grande distribuição de tamanhos nos estudos anteriores, onde encontram-se esferas de 2 µm³⁷ a 500 µm¹⁴. Diversos fatores no processo de fabricação podem levar a essas variações de tamanho, como velocidade de agitação da fase aquosa, volume do solvente e concentração do surfactante, também chamado de agente tensioativo.³⁸

O surfactante mais utilizado nesta técnica é o PVA, escolhido para este estudo, devido a sua capacidade de gerar microesferas menores de acordo com sua concentração.³⁶ Esta substância age na estabilização da emulsão e reduz a tensão superficial da fase contínua, evitando a união e aglomeração das micropartículas³⁶, porém na concentração utilizada de 1% foi possível visualizar algumas esferas aglomeradas e não separadas completamente, que podem ser observadas pelas setas na imagem captada pelo MEV (Fig. 1(A)), semelhante ao resultado obtido por Bao et al.¹⁴ e divergente do estudo conduzido por Nandagiri et al.³¹, o qual com a mesma concentração não obteve aglomeração.

Através das imagens obtidas no MEV (Fig.1) foi possível notar em sua maioria o formato esférico e uniforme das micropartículas obtidas, que pode ser explicado pelo uso do diclorometano como solvente na produção de microesferas de polímero, o mais comumente utilizado, que além da vantagem no formato, possui alta volatilidade e eficiência de encapsulamento.³⁶ Outra característica das microesferas produzidas foi a superfície lisa e livre de poros, em concordância com a maioria dos estudos anteriores a este^{31,32,39,40,41}, que pode ser explicada pela evaporação lenta do solvente, visto que uma rápida evaporação ocasiona em uma superfície mais porosa e conseqüentemente, rápida liberação do fármaco encapsulado.

O teste de eficiência de encapsulamento do fármaco obteve bons resultados ($85,2 \pm 3,5 \%$), demonstrando que, aproximadamente 8,52 mg/l de sinvastatina foi incorporada às microesferas de PLGA, resultado semelhante foi obtido em estudos anteriores.^{14,32,42} O microencapsulamento de fármaco está relacionado a alguns fatores, entre eles, a concentração de fármaco utilizado na formação da amostra.³⁶ Neste estudo, utilizou-se 10% de sinvastatina em relação ao copolímero (m/m), devido ao estudo de Nandagiri et al.³¹ afirmarem que nesta proporção havia a melhor incorporação da sinvastatina, porém a %EE encontrada foi maior ($92,2 \pm 2,1 \%$), e pode ser explicada pelo tipo de solvente utilizado

(acetato de etila), visto que este material influencia na viscosidade da fase dispersiva e, consequentemente, na quantidade de fármaco encapsulado, assim como a velocidade de evaporação do mesmo. Maior viscosidade da fase dispersiva e uma evaporação mais rápida do solvente irão resultar em uma maior eficiência de encapsulamento.³⁶ A análise pelo FT-IR dos materiais utilizados neste estudo e das microesferas, mostrou que não houve perda de grupos funcionais entre os espectros, confirmando que houve a incorporação da sinvastatina pelo polímero.

O teste *in vitro* de liberação da SIN mostrou uma liberação bem lenta durante todo o período, sem períodos iniciais de liberação muito rápida, como visto em outros estudos.^{14,24,32,37,39} Nos 4 primeiros dias, menos de 2% do fármaco foi liberado e o perfil de liberação se mostrou controlado e bem lento (Fig. 4), obtendo um total de quase 5% de SIN liberada em 25 dias. A lenta liberação da SIN pelas micropartículas foi atribuída a insolubilidade da droga, resultando na progressiva dissolução e difusão da superfície das micropartículas em contato com o PBS. Além disso, a interação química entre partículas de SIN e PLGA podem causar o aprisionamento do fármaco no interior das partículas e, consequentemente uma liberação mais lenta.^{31,41}

A maioria dos estudos similares a este utiliza PLGA contendo a razão 50:50 de ácido lático e glicólico, o qual sofre hidrólise muito mais rápido

se comparado ao PLGA de razão 82:18 aqui utilizado.³⁵ Consequentemente, com o PLGA hidrolisado mais lentamente, ocorre uma degradação mais devagar, o que pode explicar a liberação mais lenta da SIN pelas microesferas.

A morfologia das microesferas também parece interferir na velocidade de liberação do fármaco, visto que estruturas mais porosas permitem que o PBS entre com mais facilidade e o processo de degradação inicie mais rapidamente.²⁴ Nesta amostra elas se mostraram com a superfície lisa e sem a presença de poros, confirmando que menor porosidade tem liberação mais lenta do fármaco, enquanto que esferas porosas demonstraram uma rápida liberação inicial.¹⁴ Outro fator que influencia na liberação do fármaco é o tamanho das partículas. Geralmente, o menor diâmetro das partículas encurta o caminho da difusão para liberação do fármaco e, consequentemente, a liberação é mais rápida³⁴, como foi evidenciado por Terukina et al.⁴³, onde nanoesferas (300 nm) demonstraram uma dissolução muito mais rápida do que microesferas (20 μm). Neste estudo observou-se que, mesmo com a presença de partículas menores ($\sim 30 \mu\text{m}$), a quantidade de SIN liberada foi baixa e controlada ao longo do período, sem períodos de rápida liberação.

É provado por estudos *in vitro*, que a SIN encapsulada por micropartículas de polímero tem capacidade de induzir a osteogênese de células-tronco

mesenquimais da medula óssea por aumentar a expressão de genes osteogênicos, especialmente a osteocalcina, e subsequentemente elevar a atividade da fosfatase alcalina e mineralização^{24,31,44}, a maioria destes estudos não fornece a quantidade (mg) de SIN liberada para que houvesse estímulo da formação óssea, dificultando que haja um consenso sobre a dose ideal a ser utilizada para tal propósito. O estudo de Nandagiri et al.³¹ sugere que aproximadamente 0,5 mg de SIN liberada em 11 dias foi capaz de aumentar a formação óssea *in vitro*, neste estudo foi liberado aproximadamente 0,45 mg de SIN em 9 dias, demonstrando potencial para agir na formação óssea. Microesferas de PLGA com SIN não apresentaram efeito citotóxico no organismo e nas células-tronco da medula óssea.^{37,45} Alguns estudos já corroboram esses resultados *in vivo*, chegando à conclusão que a SIN realmente aumenta a formação de BMP2, um agente osteoindutor que eleva a formação óssea além de ser um potente estimulador da neovascularização.^{32,39,45} Achados histomorfométricos sugerem que microesferas de PLGA com SIN incorporadas a substituto ósseo sintético, causaram aumento da formação óssea em defeitos ósseos críticos na calvária de coelhos, significativamente maior que os defeitos sem a presença do fármaco.⁴⁰ Foi sugerido que os efeitos da SIN na formação óssea têm tendência a serem dependentes da dose de fármaco⁴⁶, porém o estudo *in vivo* de Naito

et al.⁴⁰ não demonstrou diferenças significativas nas concentrações de SIN diferentes. Mesmo com os variados resultados de estudos anteriores em relação a quantidade de SIN liberada no meio em relação ao tempo, neste estudo a liberação cumulativa em 25 dias foi de 0,98 mg aproximadamente, o que corresponde apenas 5% da SIN presente nas microesferas, enquanto que no estudo de Naito et al.⁴⁰ essa quantidade foi de 0,583 mg ao final de 31 dias e mostrou-se eficiente na formação óssea, o que sugere que as microesferas aqui obtidas podem ser utilizadas livres de um arcabouço como meio de liberação lento e controlado de SIN para regeneração óssea, em acordo com Terukina et al.⁴³ que usaram microesferas livres e promoveram formação óssea em defeito ósseo *in vivo*.

Conclusão

A sinvastatina incorporada às microesferas de PLGA produzidas através do método de simples emulsão e evaporação do solvente apresentaram características morfológicas apropriadas e alta eficiência de encapsulamento. Além disso, conseguiu-se um sistema de liberação controlado de sinvastatina com liberação lenta e sem a rápida liberação inicial. Tendo em vista as propriedades de osteocondução e osteoindução das substâncias utilizadas na produção destas microesferas, sugere-se

potencial para ser empregado como biomaterial na regeneração tecidual óssea.

Referências

1. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005;32(2):212-8.
2. Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2009;36(12):1048-58.
3. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23(4):313-23.
4. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24:237-59.
5. Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(5):22–38.
6. McAllister BS, Haghighat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol*. 2007;78(3):377–96.
7. Hämmelerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol* 2000. 1998;17:151-75.

8. Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes. *Periodontol* 2000. 1999;19:151-63.
9. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34(8):962-9.
10. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*. 2010;89(8):791-6.
11. Motta AC, Duek EAR. Synthesis, characterization, and “in vitro” degradation of poly(L-lactic acid-co-glycolic acid), PLGA. *Matéria (Rio J)* 2006;11(3):340-350.
12. Lämsman S, Pääkkö P, Ryhänen J, Kellomäki M, Waris E, Törmälä P, Waris T, Ashammakhi N. Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: histological evaluation in the subcutis of experimental design. *J Craniofac Surg*. 2006;17(6):1121-8.
13. Gómez G, Korkiakoski S, González MM, Lämsman S, Ellä V, Salo T, Kellomäki M, Ashammakhi N, Arnaud E. Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer scaffolds. *J Craniofac Surg*. 2006;17(5):935-42.

14. Bao TQ, Hiep NT, Kim YH, Yang HM, Lee BT. Fabrication and characterization of porous poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres for use as a drug delivery system. *J Mater Sci.* 2011;46:2510-2517.
15. Boden SD. Bioactive factors for bone tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;367:84-94.
16. Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science* 2000;289:1498–500.
17. Rios HF, Lin Z, Oh B, Park CH, Giannobile WV. Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. *J Periodontol.* 2011;82(9):1223-37.
18. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology.* 2011;99(1):1-7.
19. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999;286(5446):1946–49.
20. Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Güngör T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH. The ability of the statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res.* 2003;18(1):88-96.

21. Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins by MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem.* 2004;92(3):458-471.
22. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology.* 2003;144(2):681-92.
23. Ruiz-Gaspa S, Nogues X, Enjuanes A, Monllau JC, Blanch J, Carreras R, Mellibovsky L, Grinberg D, Balcells S, Díez-Perez A, Pedro-Botet J. Simvastatin and atorvastatin enhance gene expression of collagen type 1 and osteocalcin in primary human osteoblasts and MG-63 cultures. *J Cell Biochem.* 2007;101(6):1430-8.
24. Nath SD, Linh NT, Sadiasa A, Lee BT. Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bone tissue regeneration. *J Biomater Appl.* 2014;28(8):1151-63.
25. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T, Goto J, Yamamura M, Makino H. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol.* 2008;196(3):601-13.

26. Mukai T, Otsuka F, Otani H, Yamashita M, Takasugi K, Inagaki K, Yamamura M, Makino H. TNF-alpha inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356(4):1004-10.
27. Encarnação ÍC. Assessment of the association of simvastatin and PLGA+HA scaffolds on bone repair in defects created in rat calvaria. 2012. 127 p. Dissertation (Master) - Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.
28. Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58:3-18.
29. Whang K, McDonald J, Khan A, Satsangi N. A novel osteotropic biomaterial OG-PLG: synthesis and in vitro release. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74A(2):237-46.
30. Ma B, Clarke SA, Brooks RA, Rushton N. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. *Acta Biomater*. 2008;4(1):149-55.
31. Nandagiri VK, Muttu C, Daly J, Ramtoola Z, Ciardelli G, Montecvecchi FM. Preparation and characterization of simvastatin loaded PLGA microparticles for tissue engineering applications. *Current Research in Pharmaceutical Sciences* 2012;2:81-90.

32. Zhang HX, Xiao GY; Wang X, Dong ZG, Ma ZY, Li L, Li YH, Pan X, Nie L. Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103A:3250-8.
33. Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *J Biomater Appl*. 2015;29(7):965-76.
34. Bazzo GC, Lemos-Senna E, Gonçalves MC, Pires ATN. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly(hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. *J Braz Chem Soc*. 2008;19(5):914-21.
35. Jain RA. The manufactures techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475-90.
36. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm*. 2008;363(1-2):26-39.
37. Nath SD, Son S, Sadiasa A, Min YK, Lee BT. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method

for delivering simvastatin for bone regeneration. *Int J Pharm.* 2013;443(1-2):87-94.

38. O'Donnell PB, McGinity. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28:25-42.

39. Tai IC, Fu YC, Wang CK, Chang JK, Ho ML. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/Hap microspheres enhances bone repair. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:3895-904.

40. Naito Y, Terukina T, Galli S, Kozai Y, Vandeweghe S, Tagami T, Ozeki T, Ichikawa T, Coelho PG, Jimbo R. The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria. *Int J Pharm.* 2014;461:157-62.

41. Gentile P, Nandagiri VK, Daly J, Chiono V, Mattu C, Tonda-Turo C, Ciardelli G, Ramtools Z. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. *Mater Sci C Mater Biol Appl.* 2016;59:249-57.

42. Masaeli R, Kashi TSJ, Dinarvand R, Tahriri M, Rakhshan V, Esfandyari-Manesh M. Preparation, characterization and evaluation of drug release properties of simvastatin-loaded PLGA microspheres. *Iran J Pharm Res.* 2016;15:205-211.

43. Terukina T, Naito Y, Tagami T, Morikawa Y, Henmi Y, Prananingrum W, Ichikawa T, Ozeki T. The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration in vitro and in vivo: Comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016;33:136-142.
44. Wang CZ, Fu YC, Jian SC, Wang YH, Liu PL, Ho ML, Wang CK. Synthesis and characterization of cationic polymeric nanoparticles as simvastatin carriers for enhancing the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Colloid Interface Sci.* 2014;432:190-0.
45. Fu YC, Wang YH, Chen CH, Wang CK, Wang GJ, Ho ML. Combination of calcium sulfate and simvastatin-controlled release microspheres enhances bone repair in critical-sized rat calvarial bone defects. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:7231-40.
46. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280:874-7.

Legenda das Figuras

Figura 1- Fotomicrografias das micropartículas obtidas por MEV, em aumentos de (A) 100x, (B) 500x, (C) 850x e (D) 2000x. As setas indicam a presença de aglomeração e certa coalescência em algumas microesferas.

Figura 2- Análise da distribuição do tamanho das microesferas.

Figura 3- Espectro de FT-IR da sinvastatina (a), PLGA (b) e das microesferas de PLGA com sinvastatina (c).

Figura 4- Perfil de liberação da SIN no período de 25 dias em PBS.

ARTICLE – ENGLISH VERSION

**PREPARATION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* DRUG
RELEASE OF SIMVASTATIN LOADED POLY(LACTIC-CO-
GLYCOLIC ACID) (PLGA) MICROSPHERES**

This article is formatted on standards of the *Journal of Biomedical
Materials Research Part A*

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* DRUG RELEASE OF SIMVASTATIN LOADED POLY(LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) (PLGA) MICROSPHERES

Nathalia PJ Pinto⁽¹⁾, Giovana C Bazzo⁽²⁾, Águedo Aragones⁽³⁾, Cesar AM Benfatti⁽¹⁾, Ricardo S Magini⁽¹⁾

⁽¹⁾ Center for Education and Research on Dental Implants (CEPID), Post-Graduate Program in Dentistry (PPGO), Department of Dentistry (ODT), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianopolis, Santa Catarina, Brazil.

⁽²⁾ Food Science and Technology (CTA), Agrarian Science Center (CCA), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianopolis, Santa Catarina, Brazil.

⁽³⁾ Biocenter, Florianopolis, Santa Catarina, Brazil.

Corresponding author:

Nathalia PJ Pinto, Center for Education and Research on Dental Implants (CEPID), Post-Graduate Program in Dentistry (PPGO), Department of Dentistry (ODT), Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianopolis, 88040-900, Brazil.

Email: n.jordao@hotmail.com

Abstract

The aim of this study was to produce and characterize the PLGA microspheres encapsulating simvastatin (SIM), determine the quantity of drug encapsulated, and *in vitro* drug release to obtain a novel biomaterial for bone regeneration, composed of free microspheres without scaffolds presenting slow and controlled release. The SIM-loaded PLGA microspheres were prepared through the O/W emulsion solvent evaporation technique. The characterization was made by scanning electron microscopy, laser diffraction, and reflectance Fourier transform spectroscopy (FT-IR). The drug encapsulation efficacy was evaluated using a UV spectrophotometer. The sample was incubated in PBS for 25 days to determine the *in vitro* drug release. The microspheres were homogeneous with smooth surfaces and regular spherical shape. The medium size was 109 μm . The drug encapsulation efficacy was 85.2% (± 3.53), and FT-IR spectrum confirmed that SIM was successfully loaded into the polymer. *In vitro* study demonstrated a slow release of SIM, reaching 0,98 mg in 25 days. These data suggest that drug-loaded microspheres have potential to be used as a biomaterial for enhancing bone formation, due to its capacity to provide effective controlled release of SIM without initial burst release.

Keywords

PLGA; simvastatin; microspheres; drug release; osteogenic

Running Heads

Characterization and drug release of SIM loaded PLGA microspheres

Introduction

In dentistry, tooth loss is a common situation, and sometimes it will be challenging to treat with dental implants due to the dimensional ridge alterations of post-extraction sockets.^{1,2} When the resorption of the bone walls does not allow this kind of treatment, bone augmentation procedures will be necessary in post-extraction site to enable the implant installation, optimizing the functional and aesthetic results.³⁻⁵

The autogenous bone is considered gold standard in bone augmentation, but its use comes with certainly difficulties and limitations.⁶ Therefore, the study of alternatives biomaterials with osteoinduction and osteoconduction properties has been extensively explored.⁷⁻¹⁰ Among these biomaterials there is the poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), a synthetic and biocompatible copolymer, with great physico-chemical properties, which is considered a good osteoconductive product.¹¹⁻¹³

PLGA has clinical applicability in many fields, such as medicine, pharmacy and dentistry, where it has been used in form of scaffolds and membranes. The use of PLGA microspheres has been reported for drug release systems and regenerative procedures.¹⁴

The recombinant human bone morphogenetic proteins (rhBMP2) is an alternative for bone augmentation, however its use has high cost and risk¹⁵⁻¹⁸, and leads to research for products with osteoinduction capacity,

like the statins, commonly used in the cholesterol-lowering treatment. Among the known statins, it is noteworthy the simvastatin.¹⁹ This drug enhances the expression level of the morphogenetic proteins (BMP2), osteopontin (OP), collagen type I, sialoprotein and osteocalcin (OS), and promotes osteoblastic differentiation for new bone formation.²⁰⁻²⁴ In addition, per induction of osteoblastic differentiation, the simvastatin antagonize the activation of kinase protein through tumor necrosis factor alpha (TNF α), it will revert their suppressor effect and prevents the BMP2 inhibition. This will allow the osteogenic process, due to the activation of BMP cascade, and consequently the expression of osteogenic markers, like Runx2, OS and alkaline phosphatase (ALP).²⁵⁻²⁷

In 1999, the simvastatin was used for the first time *in vivo* and demonstrated its stimulation capability for bone formation, however the drug administration and dosage can alter the results, and it can be toxic to the tissues or not be sufficient.²⁸⁻³⁰

The use of simvastatin associated with conducted materials, which control their release has been tested in several studies, and PLGA is one of them.^{31,32} PLGA microspheres with simvastatin have shown efficacy in the nontoxic release and it promotes cellular aggregation and proliferation in bone tissue. Nevertheless, the use of this material form is scant without their incorporation to scaffolds.³³

More in vitro and in vivo studies in order to develop a novel biomaterial for bone augmentation with osteoinduction and osteoconduction properties, using simvastatin loaded PLGA microspheres, which has viability to use in humans. The most important aspect to achieve a more controlled and prolonged release is the drug release profile. Because of that, the purpose of this work was to produce PLGA microspheres encapsulating SIM with a slow release profile, without initial burst release.

Materials and Methods

Materials

PLGA Resomer LG 824 S (82L:18G) was purchased from Evonik Boehringer Ind. Pharma GmbH & Co., Germany. Simvastatin ($\geq 98\%$ HPLC) was obtained from Merck, Germany. Poly(vinyl acetate) (PVA) was obtained from Sigma-Aldrich, Canada. Phosphate buffered saline (PBS – 9,88 g/l, ph 7,4) was purchased from Kasvi, Brazil. Dichloromethane p.a. (99,9% HPLC) was obtained from Vetec, Brazil.

Fabrication of simvastatin loaded PLGA microspheres

The microspheres of PLGA with simvastatin were prepared through the oil-in-water (O/W) emulsion-solvent evaporation technique. Briefly, 500 mg of PLGA was dissolved in 20 ml of dichloromethane in a

concentration of 2,5% w/v until their total dissolution, then 50 mg of SIM was added in order to obtain drug polymer ratio of 10% w/w (internal phase). The solution was dropped slowly into 400 ml of aqueous 1% PVA (continuous phase), under vigorous mixing using a magnetic stirrer at room temperature. The resulting emulsion was continuously stirred overnight to allow the complete evaporation of the solvent. The solid microspheres were collected by decantation, washed three times with distilled water, dried and stored at room temperature.

Morphology and size

The sample was mounted on aluminum stubs, gold coated, then morphology of microspheres was determined by scanning electron microscopy (JEOL JSM-6390LV, USA), at 10 kV. Microparticle size was determined by laser diffraction (Mastersizer 2000, Malvern Instrument Ltd., UK).

Characterization by FT-IR

The SIM, PLGA and SIM incorporated to microspheres were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR Spectrometer Cary 600 Series, Agilent Technologies, USA).

Loading efficiency and *in vitro* drug release study

The drug encapsulation efficiency was evaluated to determine the amount of SIM that was successfully loaded into the PLGA microspheres. An

amount of microparticles (50 mg) equivalent to 5 mg of SIM was accurately weighed, and then dissolved and diluted in dichloromethane to achieve a drug concentration of 10 mg/L. The solution was analyzed in a UV spectrophotometer (SP 2000 UV, Bel Photonics, Italy) at a wavelength of 240 nm and the SIM content present in the microparticles was obtained from a calibration curve. The experiments were carried out in duplicate. The loading efficiency was obtained using Equation³⁴: $LE\% = \text{drug found in microparticles (mg)} / \text{drug initially added to the formulation (mg)} \times 100$.

To obtain the drug release curve, the microspheres were weighed (15,3 mg of microspheres containing 0,6 mg of SIM) and incubated in 60 ml of PBS (pH 7,4), for 25 days in thermostatic bath at 36°C. At specific time intervals, 3 ml from the prepared solution sample was collected and returned to recipients after absorbance records. The absorbance was detected using the same UV spectrophotometer at 240 nm. A standard calibration curve of known concentrations of SIM in acetonitrile was used to quantify the amount of SIM released from microspheres. The test was analyzed in triplicate.

Results

Morphology and size

The scanning electron microscopy (SEM) images of the microspheres is presented in Fig. 1. It is evident that the morphology of the microspheres is homogeneous with smooth surfaces and regular spherical shape. The laser diffraction analysis demonstrated 80% was between 37 μm to 690 μm approximately, and the medium size was $\sim 109 \mu\text{m}$ (Fig. 2).

Characterization by FT-IR

From the FT-IR transmittance spectra of PLGA (Fig. 3(b)), the $-\text{OH}$ stretching vibrations ($3200\text{--}3500 \text{ cm}^{-1}$), $-\text{CH}$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ stretching ($2900\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$), carbonyl group $\text{C}=\text{O}$ absorption band (1750 cm^{-1}), $\text{C}-\text{O}$ stretching ($1000\text{--}1250 \text{ cm}^{-1}$) were observed and characterize the copolymer. The SIM spectra (Fig. 3(a)) showed a broad band at $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ related to free $\text{O}-\text{H}$ stretching vibration, $\text{C}-\text{H}$ stretching vibration (3011 , 2959 , and 2972 cm^{-1}), and $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration of ester and lactone carbonyl functional group (1714 cm^{-1}). SIM-loaded PLGA microspheres spectra (Fig. 3(c)) showed peaks at $\sim 3,500 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 1,700 \text{ cm}^{-1}$, confirming that SIM was successfully incorporated into the PLGA.

Loading efficiency and *in vitro* drug release study

The loading efficiency test revealed $85,2 \pm 3,5 \%$ of simvastatin was loaded within PLGA microspheres in a drug polymer ratio 1:10. The SIM drug release curve (Fig. 4) from PLGA microspheres demonstrated a sustained and slow release in the whole 25 days, where almost 5% was

released. Indicating that 0,98 mg/l of SIM was released in the period test. Subsequently, the drug release rate was approximately 0,039 mg/day.

Discussion

The physico-chemical properties of drug-loaded microspheres made with copolymer can vary according to many factors involved in the choice of materials and their concentrations, technique of production, and each step from fabrication process of sample.³⁵ In this study, to obtain a slow and controlled release of the drug, the single emulsion/evaporation method (O/W) was chosen, because it is the easiest technique to encapsulate hydrophobic drugs, as is the case of simvastatin used here.³⁶

The microparticle size found in this study had a large variation (20 μm to 700 μm). This could be due to the fact that no were used filter or sieve to limit and select the required size. It was possible to identify this size distribution in the anterior studies, where there were spheres from 2 μm ³⁷ to 500 μm ¹⁴. Many factors in the fabrication process would lead to this size variation, as the stirrer velocity in aqueous phase, the solvent volume and surfactant concentration, also called tensioactive agent.³⁸

The most used surfactant in this method is PVA, and it was chosen for this study because it should be able to produce microspheres with regular size. This agent acts in the stabilization of emulsion and reduce the

surface tension of continuous phase, preventing the union and aggregation of the microparticles.³⁶ However, at 1% PVA it was possible to note some agglomeration and not completely separate spheres, which can be observed by the arrows in the SEM image (Fig. 1(A)). This was similar to the result obtained by Bao et al.¹⁴, and it diverged from the study conducted by Nandagiri et al.³¹ where they did not observe any agglomeration of the spheres.

Through the SEM images (Fig. 1) it was possible to notice the spherical and uniform format of the microparticles produced in this study. This can be explained for the use of dichloromethane as solvent in the production process of the copolymer microspheres. DCM is the most common solvent used, not only the advantage in shape but also the high volatility and loading efficiency.³⁶ Another characteristic from the microspheres obtained were the smooth surface without porous, it is in accordance with earlier studies.^{31,32,39,40,41} This morphological characteristic can be explained by the slowly solvent evaporation, whereas a fast evaporation causes more porous surface and consequently fast release of encapsulated drug.

The loading efficiency test showed good results ($85,2 \pm 3,5$ %), demonstrating approximately 8,52 mg/l of SIM was incorporated in the PLGA microspheres. Similar results were observed in earlier

studies.^{14,32,42} The drug microencapsulation is related to some factors, among them the drug concentration used in the sample fabrication.³⁶ In this study, 10% of SIM was used in a copolymer ratio (w/w), according to Nandagiri et al.³¹ study, where they affirmed that this proportion had the best SIM incorporation. However, the %LE related was superior ($92,2 \pm 2,1$ %). This can be explained by the type of solvent used (ethyl acetate), seeing that this material has influence in the viscosity of the dispersed phase and consequently, in the quantity of drug encapsulated, as the evaporation velocity of the solvent. A major viscosity in the dispersed phase and a fast solvent evaporation will result in high drug loading efficacy.³⁶ The FT-IR analysis from the materials used in this study and from the microspheres demonstrated there are no loss of functional groups amongst the spectrums, confirming successful SIM incorporation within PLGA microspheres.

The *in vitro* drug release test of SIM showed a very slow release during all the period, without an initial burst release, as seen in others studies.^{14,24,32,37,39} Four days after the released study, only 2% of drug was released. The drug release profile was controlled and very slow (Fig. 4), obtaining a cumulative release of almost 5% at 25 days. The slow release of SIM from microparticles was attributed to the drug hydrophobicity, resulting in progressive dissolution and diffusion from the micro particle

surface in contact with PBS. Moreover, the chemical interaction between SIM and PLGA particles might cause a capturing of the drug within the particles and therefore cause a slower release.^{31,41} The majority of studies similar to this one have used PLGA 50:50 ratio of lactic and glycolic acids which suffer hydrolysis faster than PLGA 82:18 ratio which was used here.³⁵ Consequently, when PLGA is slowly hydrolyzed the degradation also will be slow and this could explain the SIM slow release from microspheres. The microspheres morphology also seems to interfere in drug release velocity, seeing that more porous particles lead more PBS inside them, then the degradation process starts faster.²⁴ In this sample, the microspheres showed a smooth surface free of porous and confirming that less porosity conduct to slow release, while porous microspheres demonstrated a burst initial release.¹⁴ Another factor that influences in the drug release is the particle size. Generally, the smaller particle diameter shortens the diffusion path for drug release, and then the release is faster³⁴, as evidenced by Terukina et al.⁴³, where nanospheres (300 nm) had a faster dissolution than microspheres (20 μ m). In this study, it was observed that even with smaller particles (\sim 30 μ m), the quantity of SIM released was lower and sustained during the test, without peaks of rapid release.

It had been proved by *in vitro* studies that SIM-loaded polymer microspheres have the capacity to induce osteogenic in bone marrow mesenchymal stem cells by enhancing the expression of osteogenic genes, as the type I collagen, osteopontin, sialoprotein, and osteocalcin, moreover the capacity to elevate alkaline phosphatase activity and mineralization.^{24,31,44} The majority of studies does not provide the quantity of SIM (mg) released to stimulate bone formation *in vitro*, making it difficult to obtain an ideal dose of SIM to be used for this purpose. The study of Nandagiri et al.³¹ suggests that approximately 0,5 mg of SIM released at 11 days was capable to enhances bone formation *in vitro*, in this present work was released about 0,45 mg of SIM at 9 days, demonstrating the potential to act in the bone formation. Furthermore, microspheres does not present cytotoxic effect in the body neither in bone marrow stem cells.^{37,45} Some *in vivo* studies corroborate these results. They concluded that SIM really enhance the formation of bone morphogenetic protein 2, an osteoinductor agent that elevates the bone formation and the stimulation of neovascularization.^{32,39,45} Histomorphometric results suggest the effect of PLGA microspheres with SIM, when incorporated in synthetic bone substitute enhanced the bone formation in rabbit calvaria critical size defects and was significantly higher than the non-incorporated group.⁴⁰

It was suggested that the SIM effects in bone formation have the tendency to be dose dependent⁴⁶. However, the *in vivo* study from Naito et al.⁴⁰ did not demonstrate significant differences between SIM concentrations. Even with varying results from earlier studies concerning quantity of SIM released in relation to time, in this present study the SIM cumulative release at 25 days was approximately 0,98 mg. Whereas in the Naito et al.⁴⁰ study this quantity was 0,583 mg at 31 days and it demonstrated efficacy on bone formation. This fact suggested that microspheres obtained here could be used as a slow and controlled SIM delivery system for bone regeneration without scaffold incorporated, in accordance to Terukina et al.⁴³ that used free microspheres and promoted bone formation in a bone defect area *in vivo*.

Conclusion

Simvastatin loaded PLGA microspheres were successfully produced through single emulsion/solvent evaporation method with appropriate morphologic characteristics and high encapsulation efficiency. One of the prime purposes of this work was to obtain a drug delivery system that lessen the initial burst and promotes a controlled release of simvastatin; furthermore, the osteoconduction and osteoinduction properties of the

manufacturing substances, suggest the potential to be used as a biomaterial in bone tissue regeneration.

References

1. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*. 2005;32(2):212-8.
2. Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2009;36(12):1048-58.
3. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23(4):313-23.
4. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009;24:237-59.
5. Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(5):22–38.
6. McAllister BS, Haghighat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol*. 2007;78(3):377–96.
7. Hämmelerle CH, Karring T. Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontol* 2000. 1998;17:151-75.

8. Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC. Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes. *Periodontol* 2000. 1999;19:151-63.
9. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008;34(8):962-9.
10. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nör JE. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res*. 2010;89(8):791-6.
11. Motta AC, Duek EAR. Synthesis, characterization, and “*in vitro*” degradation of poly(L-lactic acid-co-glycolic acid), PLGA. *Matéria (Rio J)* 2006;11(3):340-350.
12. Länsman S, Pääkkö P, Ryhänen J, Kellomäki M, Waris E, Törmälä P, Waris T, Ashammakhi N. Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: histological evaluation in the subcutis of experimental design. *J Craniofac Surg*. 2006;17(6):1121-8.
13. Gómez G, Korkiakoski S, González MM, Länsman S, Ellä V, Salo T, Kellomäki M, Ashammakhi N, Arnaud E. Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer scaffolds. *J Craniofac Surg*. 2006;17(5):935-42.

14. Bao TQ, Hiep NT, Kim YH, Yang HM, Lee BT. Fabrication and characterization of porous poly(lactic-*co*-glycolic acid) (PLGA) microspheres for use as a drug delivery system. *J Mater Sci.* 2011;46:2510-2517.
15. Boden SD. Bioactive factors for bone tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;367:84-94.
16. Service RF. Tissue engineers build new bone. *Science* 2000;289:1498–500.
17. Rios HF, Lin Z, Oh B, Park CH, Giannobile WV. Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. *J Periodontol.* 2011;82(9):1223-37.
18. Casagrande L, Cordeiro MM, Nör SA, Nör JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology.* 2011;99(1):1-7.
19. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999;286(5446):1946–49.
20. Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Güngör T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH. The ability of the statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res.* 2003;18(1):88-96.

21. Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins by MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem.* 2004;92(3):458-471.
22. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology.* 2003;144(2):681-92.
23. Ruiz-Gaspa S, Nogues X, Enjuanes A, Monllau JC, Blanch J, Carreras R, Mellibovsky L, Grinberg D, Balcells S, Díez-Perez A, Pedro-Botet J. Simvastatin and atorvastatin enhance gene expression of collagen type 1 and osteocalcin in primary human osteoblasts and MG-63 cultures. *J Cell Biochem.* 2007;101(6):1430-8.
24. Nath SD, Linh NT, Sadiasa A, Lee BT. Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bone tissue regeneration. *J Biomater Appl.* 2014;28(8):1151-63.
25. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T, Goto J, Yamamura M, Makino H. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol.* 2008;196(3):601-13.

26. Mukai T, Otsuka F, Otani H, Yamashita M, Takasugi K, Inagaki K, Yamamura M, Makino H. TNF- α inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356(4):1004-10.
27. Encarnação ÍC. Assessment of the association of simvastatin and PLGA+HA scaffolds on bone repair in defects created in rat calvaria. 2012. 127 p. Dissertation (Master) - Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.
28. Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58:3-18.
29. Whang K, McDonald J, Khan A, Satsangi N. A novel osteotropic biomaterial OG-PLG: synthesis and *in vitro* release. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74A(2):237–46.
30. Ma B, Clarke SA, Brooks RA, Rushton N. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. *Acta Biomater*. 2008;4(1):149-55.
31. Nandagiri VK, Muttu C, Daly J, Ramtoola Z, Ciardelli G, Montecvecchi FM. Preparation and characterization of simvastatin loaded PLGA microparticles for tissue engineering applications. *Current Research in Pharmaceutical Sciences* 2012;2:81-90.

32. Zhang HX, Xiao GY; Wang X, Dong ZG, Ma ZY, Li L, Li YH, Pan X, Nie L. Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103A:3250-8.
33. Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *J Biomater Appl*. 2015;29(7):965-76.
34. Bazzo GC, Lemos-Senna E, Gonçalves MC, Pires ATN. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly(hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. *J Braz Chem Soc*. 2008;19(5):914-21.
35. Jain RA. The manufactures techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-*co*-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2475-90.
36. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm*. 2008;363(1-2):26-39.
37. Nath SD, Son S, Sadiasa A, Min YK, Lee BT. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method

- for delivering simvastatin for bone regeneration. *Int J Pharm.* 2013;443(1-2):87-94.
38. O'Donnell PB, McGinity. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;28:25-42.
39. Tai IC, Fu YC, Wang CK, Chang JK, Ho ML. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/Hap microspheres enhances bone repair. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:3895-904.
40. Naito Y, Terukina T, Galli S, Kozai Y, Vandeweghe S, Tagami T, Ozeki T, Ichikawa T, Coelho PG, Jimbo R. The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria. *Int J Pharm.* 2014;461:157-62.
41. Gentile P, Nandagiri VK, Daly J, Chiono V, Mattu C, Tonda-Turo C, Ciardelli G, Ramtools Z. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. *Mater Sci C Mater Biol Appl.* 2016;59:249-57.
42. Masaeli R, Kashi TSJ, Dinarvand R, Tahriri M, Rakhshan V, Esfandyari-Manesh M. Preparation, characterization and evaluation of drug release properties of simvastatin-loaded PLGA microspheres. *Iran J Pharm Res.* 2016;15:205-211.

43. Terukina T, Naito Y, Tagami T, Morikawa Y, Henmi Y, Prananingrum W, Ichikawa T, Ozeki T. The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration *in vitro* and *in vivo*: Comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres. J Drug Deliv Sci Technol. 2016;33:136-142.
44. Wang CZ, Fu YC, Jian SC, Wang YH, Liu PL, Ho ML, Wang CK. Synthesis and characterization of cationic polymeric nanoparticles as simvastatin carriers for enhancing the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. J Colloid Interface Sci. 2014;432:190-0.
45. Fu YC, Wang YH, Chen CH, Wang CK, Wang GJ, Ho ML. Combination of calcium sulfate and simvastatin-controlled release microspheres enhances bone repair in critical-sized rat calvarial bone defects. Int J Nanomedicine. 2015;10:7231-40.
46. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2001;280:874-7.

Figure legends

Figure 1- Photomicrografies of microparticles obtained by SEM, in magnification of (A) 100x, (B) 500x, (C) 850x and (D) 2000x. The arrows indicating some coalescence and agglomeration.

Figure 2- Distribution of microspheres particle size analysis.

Figure 3- FT-IR spectra from SIM (a), PLGA (b) and SIM loaded PLGA microspheres (c).

Figure 4- SIM drug release profile at 25 days in PBS.

CAPÍTULO III

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, MG; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. Na experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v.32, p.212-218, 2005.
- ASAHARA, T; KALKA, C; ISNER, J. M. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. **Gene Therapy**, v.7, p.451-457, 2000.
- BAO, T-Q; HIEP, N-T; KIM Y-H; YANG, H-M; LEE, B-T. Fabrication and characterization of porous poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres for use as a drug delivery system. **J Mater Sci**, v.46, p.2510-2517, 2011.
- BAZZO, GC; LEMOS-SENNA, E; GONÇALVES, MC; PIRES, ATN. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly(hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam. **J Braz Chem Soc.**, v.19, p.914-21, 2008.
- BODEN, S. D. Bioactive factors for bone tissue engineering. **Clin Orthop.**, v.84, p.367-71, 1999.
- BUSER, D; DULA, K; HESS, D; HIRT, H. P; BELSER, U. C. Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes. **Periodontol** 2000, v.19, p.151-63, 2000.
- CASAGRANDE, L; CORDEIRO, M. M; NÖR, S. A; NÖR, J. E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontol**, v.99:1-7, 2011.
- CHAPPARD, D. Bone modeling and remodeling during osseointegration. **Revue de stomatologie, de chirurgie maxillo-faciale et de chirurgie orale**, v. 114, n. 3, p. 159–65, jun. 2013.
- CHIAPASCO, M; CASENTINI, P; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.24, p.237-259, 2009.
- CORDEIRO, M. M; DONG, Z; KANEKO, T; ZHANG, Z; MIYAZAWA, M; SHI, S; SMITH, A. J; NÖR, J. E. Dental pulp tissue

engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod**, v.34, n.8, p.962-9, aug. 2008.

DRAGOO, J. L; CHOI, J. Y; LIEBERMAN, J. R; HUANG, J; ZUK, P. A; ZHANG, J; HEDRICK, M. H; BENHAIM, P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. **J Orthop Res**, v.21, p.622-9, 2003.

DUBUC, G; CHAMBERLAND, A; WASSEF, H; DAVIGNON, J; SEIDAH, N. G; BERNIER, L; PRAT, A. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.24, p.1454-9. 2004.

ENCARNAÇÃO, Í. C. Assessment of the association of simvastatin and PLGA+HÁ scaffolds on bone repair in defects created in rat calvaria. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

FASSBENDER, K; SIMONS, M; BERGMANN, C; STROICK, M; LUTJOHANN, D; KELLER, P; RUNZ H; KUHL, S; BERTSCH, T; VON BERGMANN, K; HENNERICI, M; BEYREUTHER, K; HARTMANN, T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease amyloid peptides A 42 and A 40 in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci**, v.98, p.5856-5861, 2001.

FERREIRA, L. B; BRADASCHIA-CORREA, V; MOREIRA, M. M; MARQUES, N. D. M & ARANA-CHAVEZ, V. E. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 29, n.7, p.965-976, 2015.

FU, YC; WANG, YH; CHEN, CH; WANG, CK; WANG, GJ; HO, ML. Combination of calcium sulfate and simvastatin-controlled release microspheres enhances bone repair in critical-sized rat calvaria bone defects. **Int J Nanomedicine**, v.10, p.7231-40, 2015.

GENTILE, P; NANDAGIRI, VK; DALY, J; CHIONO, V; MATTU, C; TONDA-TURO, C; CIARDELLI, G; RAMTOOLA, Z. Localized controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue

engineering application. **Mater Sci C Mater Biol Appl.**, v.59, p. 249-57, 2016.

GÓMEZ, G; KORKIAKOSKI, S; GONZÁLEZ, M. M; LANSMAN, S; ELLA, V; SALO, T; KELLOMAKI, M; ASHAMMAKHI, N; ARNAUD, E. Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer. **J Craniofacial Surg**, v.17, p.935-942, 2006.

HÄMMERLE, C. H. F. & KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontol** **2000**, v.17, p.151-75, 1998.

HO, M; CHIANG, C; LIU, Y; KUO, M. Y; LIN, S; LAI, J; LEE, B. Highly efficient release of lovastatin from poly(lactic-co-glicolic acid) nanoparticles enhances bone repair in rats. **J Orthopaedic Res**, v.28, p.1343-51, 2011.

HUANG, X; HUANG, Z; LI, W. Highly efficient release of simvastatin from simvastatin-loaded calcium sulphate scaffolds enhances segmental bone regeneration in rabbits. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 6, p. 2152–8, jun. 2014.

JADHAV, S. B; JAIN, G. K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. **J Pharm Pharmacol**, v.58, p.3-18, 2006.

JAIN, RA. The manufactures techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v.21, p.2475-90, 2000.

JANSEN, J. A; VEHOFF, J. W. M; RUHE, P. Q; KROEZE-DEUTMAN, H; KUBOKI, Y; TAKITA, H; HEDBERG, E. L; MIKOS, A. G. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. **J Control Release**, v.101, p.127-136, 2005.

KIM, S. E; THANH THUY, T. T; LEE, J. H; RO, J. Y; BAE, Y. A; KONG, Y; AHN, J. Y; LEE, D. S; OH, Y. M; LEE, S. D; LEE, Y. S. Simvastatin inhibits induction of matrix metalloproteinase-9 in rat alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract. **Exp Mol Med**, v.30; p.277-87, 2009.

KOJRO, E; GIMPL, G; LAMMICH, S; MARZ, W; FAHRENHOLZ, F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect

on the -secretase ADAM 10. **Proc Natl Acad Sci**, v.98, p.5815–5820, 2001.

KUREISHI, Y; LUO, Z; SHIOJIMA, I; BIALIK, A; FULTON, D; LEFER, D. J; SESSA, W. C; WALSH, K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nat Med**, v.6, p.1004–1010, 2000.

KWAK, B; MULHAUPT, F; MYIT, S; MACH, F. Statins as a newly recognized type of immuno modulator. **Nat Med**, v.6, p.1399 –1402, 2000.

LACOSTE, L; LAM, J. Y; HUNG, J; LETCHACOVSKI, G; SOLYMOSS, C. B; WATERS, D. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. **Circulation**, v.92, p.3172–3177, 1995.

LANSMAN, S; PAAKKO, P; RYHANEN, J; KELLOMAKI, M; WARIS, E; TORMALA, P; WARIS, T; ASHMMAKHI, N. Poly-L/D-lactide (PLDLA) fibrous implants: histological evaluation in the sub cutis of experimental design. **J Craniofacial Surg**, v.17, p.1121-28, 2006.

LI, M; ROUAUD, O; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. **Int J Pharm.**, v.363, p. 26-39, 2008.

LIMA, C. E. V. C; CALIXTRO, J. C; ANBINER, A. L. Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. **Braz Oral Res**, v.25, p.42-8, 2011.

LIU, C; ZHE, W & HONG-CHEN, S. The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor-1, bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. **Int J Oral Sci**, v.1, p.90-98, 2009.

MA, B; CLARKE, S. A; BROOKS, R. A; RUSHTON, N. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. **Acta Biomater**, v.4, p.149-55, 2008.

MACIEL-OLIVEIRA, N; BRADASCHIA-CORREA, V; ARANA-CHAVEZ V. E. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.112, p.170-9, 2011.

MAEDA, T; KAWANE, T & HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, v.144, p.681-692, 2003.

MAEDA, T; MATSUNUMA, A; KAWANE, T; HORIUCHI, N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.280, p.874-877, 2001.

MAEDA, T; MATSUNUMA, A; KURAHASI, I., et al. Introduction of osteoblast differentiation indices by statins by MC3T3-E1 cells. **J Cell Biochem**, v.92, p. 458-471, 2004.

MANSOUR, G; AL ASHWAH, A; KOURA, A. Evaluation of simvastatin grafting around immediate dental implants in dogs. **Implant Dentistry**, v. 23, n. 2, p. 195-9, abr. 2014.

MASAEI, R; KASHI, TSJ; DINARVAND, R; TAHIRI, M; RAKHSHAN, V; ESFANDYARI-MANESH, M. Preparation, characterization and evaluation of drug release properties of simvastatin-loaded PLGA microspheres. **Iran J Pharm Res.**, v.15, p. 205-211, 2016.

MCALLISTER, B. S. & HAGHIGHAT, K. Bone augmentation techniques. **J Periodontol**, v.78, n.3, p.377-396, mar. 2007.

MOON, H; KIM, S. E; YUN, Y. P; HWANG, Y; BANG, J. B; PARK, J; KWON, I. K. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. **Exp Mol Med**, v.43, p.605-612, 2011.

MOTTA, A. C., DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v.11, n.3, p.340-350, 2006.

MUKAI, T; OTSUKA, F; OTANI, H; YAMASHITA, M; TAKASUGI, K; INAGAKI, K; YAMAMURA, M; MAKINO, H. TNF-alpha inhibits

BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.18, p. 1004-1010, 2007.

MUNDY, G; GARRETT, R; HARRIS, S. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, v.286, p.1946–1949, 1999.

NAITO, Y; TERUKINA, T; GALLI, S; et al. The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect. in the rabbit calvaria. **International Journal of Pharmaceutics**, v.461, p.157-162, 2014.

NAKA, T; SAKODA, T; DOI, T; AKAGAMI, T; TSUJINO, T; MASUYAMA, T; OHYANAGI, M. Mechanical stretch induced interleukin-18 expression through angiotensin subtype 1 receptor and endothelin-1 in cardiomyocytes. **Prep Biochem Biotechnol**, v.38, p.201-12, 2008.

NANDAGIRI, V.K; MUTTU, C; DALY, J; et al. Preparation and characterization of simvastatin loaded PLGA microparticles for tissue engineering applications. **Current Research in Pharmaceutical Sciences**, v.2, p.81-90, 2012.

NATH, S. D; LINH, N. TB; SADIASA, A; LEE, B.T. Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bone tissue regeneration. **Journal of Biomaterials Applications**, v.28, n.8, p.1151-1163, 2014.

NATH, SD; SON, S; SADIASA, A; MIN, YK; LEE, BT. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. **Int J Pharm.**, v.443, p. 87-94, 2013.

NYAN, M; SATO, D; KIHARA, H; MASCHIDA, T; OHYA, K. Effects of the combination with tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. **Clin Oral Impl Res**, v.20, p.280-287, 2009.

NYAN, M; SATO, D; ODA, M; MACHIDA, T; KOBAYASHI, H; NAKAMURA, T. Bone formation with the combination of simvastatin

and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. **J Pharmacol Sci**, v.104, p.384-6, 2007.

O'DONNELL, PB; MCGINITY. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.28, p.25-42, 1997.

OHNAKA, K; SHIMODA, S; NAWATA, H; SHIMOKAWA, H; KAIBUCHI, K; IWAMOTO, Y; TAKAYANAGI, R. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, v.287, p.337-342, 2001.

OZEC, I; KILIÇ, E; GÜMÜS, C; GÖZE, F. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. **J Craniofac Surg**, v.18, p.546-50, 2007.

PARK, J. B. The use of simvastatin in bone regeneration. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.14, p.485-8, 2009.

PHILLIPS, J. E; GERSBACHA, C. A; GARCIA, A. J. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. **Biomaterials**, v.28, p.211-229, 2007.

RIOS, H. F; LIN, Z; OH, B; PARK, C. H; GIANNOBILE, W. V. Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. **J Periodontol**, v.82, p.1223-37, 2011.

RUIZ-GASPA, S; NOGUES, X; ENJUANCES, A., et al. Simvastatin and atorvastatin enhance gene expression of collagen type 1 and osteocalcin in primary human osteoblasts and MG-63 cultures. **J Cell Biochem**, v.101, p.1430-1438, 2007.

SAKAI, V. T; ZHANG, Z; DONG, Z; NEIVA, K. G; MACHADO, M. A; SHI, S; SANTOS, C. F; NÖR, J. E. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **J Dent Res**, v.89, n. 8, p.791-6, aug. 2010.

SCHROPP, L; WENZEL, A; KOSTOPOULOS, L; KARRING, T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v.23, p.313-323, 2003.

SERVICE, R. F. Tissue engineers build new bone. **Science**, v.289, p.1498–500, 2000.

STAAL, A; FRITH, J.C; FRENCH, M. H., et al. The ability of the statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. **J Bone Miner Res**, v.18, p.88-96, 2003.

STEIN, D; LEE, Y; SCHMID, M. J; KILLPACK, B; GENRICH, M. A; NARAYANA, N. Local simvastatin effects on mandibular growth and inflammation. **J Periodontol**, v.76, p.1861-70, 2005.

SUGIYAMA, M; KODAMA, T; KONISHI, K; ABE, K; ASAMI, S; OIKAWA, S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein 2 in human osteosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.271, p.688–692, 2000.

SUGIYAMA, O; DONG, S. A; SAM, P. K; BRIAN, T. F; GAMRADT, S; NANCY, Q. L; IRVIN, S. Y; CHEN, S. Y; LIEBERMAN, J. R. Lentivirus-mediated gene transfer induces long-term transgene expression of BMP-2 in vitro and new bone formation in vivo. **Mol Therapy**, v.11, p.390-398, 2005.

TAI, IC; FU, YC; WANG, CK; CHANG, JK; HO, ML. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/Hap microspheres enhances bone repair. **Int J Nanomedicine**, v.8, p.3895-904, 2013.

TERUKINA, T; NAITO, Y; TAGAMI, T; MORIKAWA, Y; HENMI, Y; PRANANINGRUM, W; ICHIKAWA, T; OZEKI, T. The effect of the release behavior of simvastatin from different PLGA particles on bone regeneration in vitro and in vivo: Comparison of simvastatin-loaded PLGA microspheres and nanospheres. **J Drug Deliv Sci Technol.**, v.33, p.136-142, 2016.

THYLIN, M. R; MCCONNELL, J. C; SCHMID, M. J; RECKLING, R. R; OJHA, J; BHATTACHARYYA, I. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. **J Periodontol**, v.73, p.1141-8, 2002.

VAN DER WEIJDEN, F; DELL'ACQUA, F; SLOT, DE. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. **J Clin Periodontol**, v.36, n.12, p.1048-58, 2009.

VIGNOLETTI, F. et al. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. **Clin Oral Implants Res.**, v.23 Suppl 5, p.22–38, fev. 2012.

WANG, CZ; FU, YC; JIAN, SC; WANG, YH; LIU, PL; HO, ML; WANG, CK. Synthesis and characterization of cationic polymeric nanoparticles as simvastatin carriers for enhancing the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. **J Colloid Interface Sci.**, v.432, p.190-0, 2014.

WHANG, K. M; MCDONALD, J; KHAN, A; SATSANGI, N. A novel osteotropic biomaterial OG-PLG: synthesis and in vitro release. **J Biomed Mater Res A**, v.74, p.237–46, 2005.

WU, Z; LIU, C; ZANG, G; SUN, H. The effect of simvastatin on remodeling of the alveolar bone following tooth extraction. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.37, p.170-6, 2008.

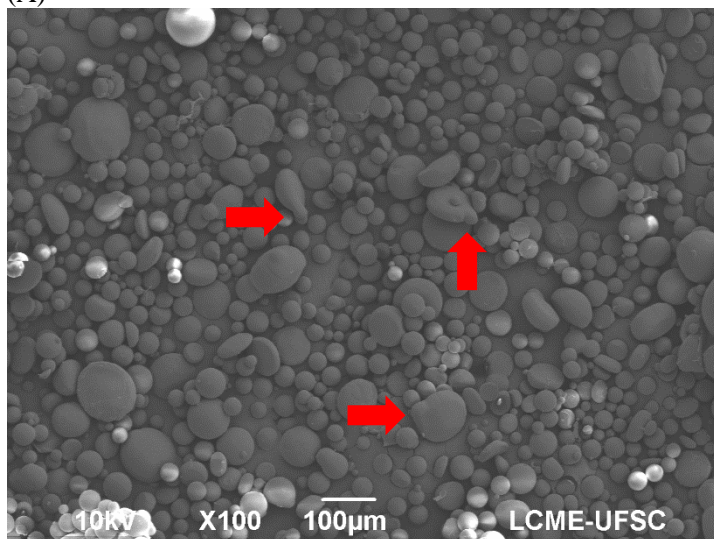
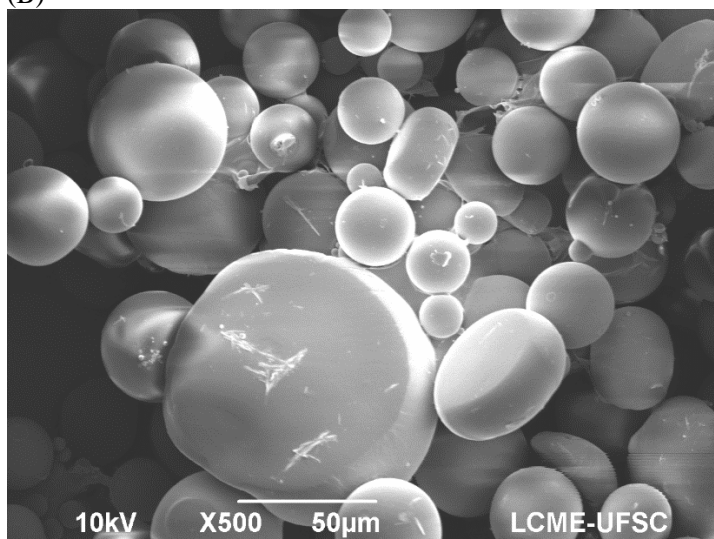
YAMASHITA, M; OTSUKA, F; MUKAI, T; OTANI, H; INAGAKI, K; MIYOSHI, T; GOTO, J; YAMAMURA, M; MAKINO, H. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. **Journal of Endocrinology**, v. 196, p. 601-613, 2008.

ZHANG, H-X; XIAO, G-Y; WANG, X.; et al. Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. **J Biomed Mater Res A**, v.103A, p.3250-3258, 2015.

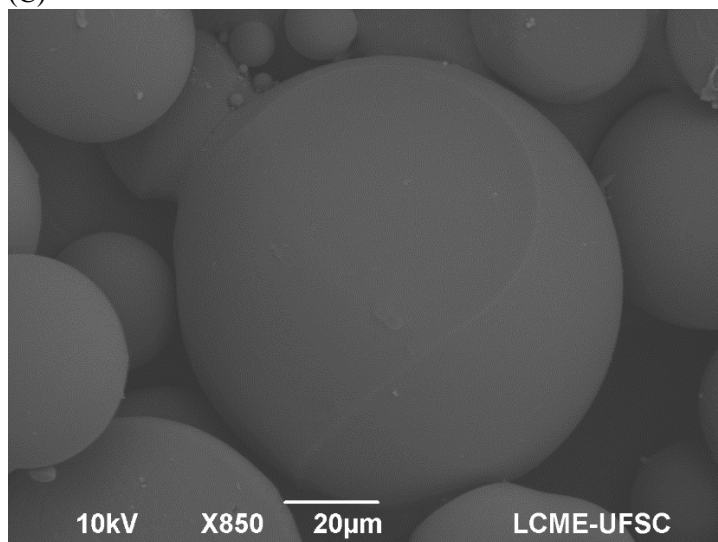
ZHANG, J; DRICU, A; SJÖVALL, J. Studies on the relationships between 7 alpha-hydroxylation and the ability of 25- and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. **Biochim Biophys Acta**, v.18, p.241-9, 1997.

ZHENG, H; GUO, Z; MA, Q; JIA, H; DANG, G. Cbfa1/osf2 Transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation In Vitro and In Vivo. **Calc Tissue Int**, v.74, p.194-203, 2004.

CAPÍTULO IV

FIGURAS DO ARTIGO**Figura 1: Imagens do MEV****(A)****(B)**

(C)



(D)

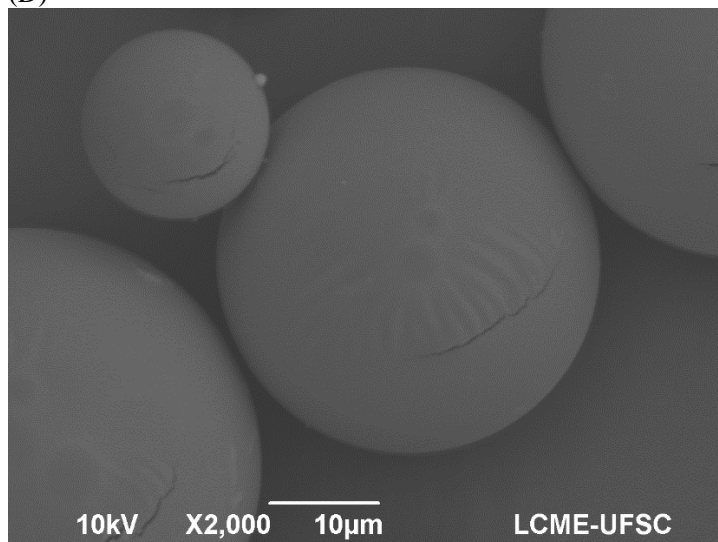


Figura 1- Fotomicrografias das micropartículas obtidas por MEV, em aumentos de (A) 100x, (B) 500x, (C) 850x e (D) 2000x. As setas indicam a presença de aglomeração e certa coalescência em algumas microesferas.

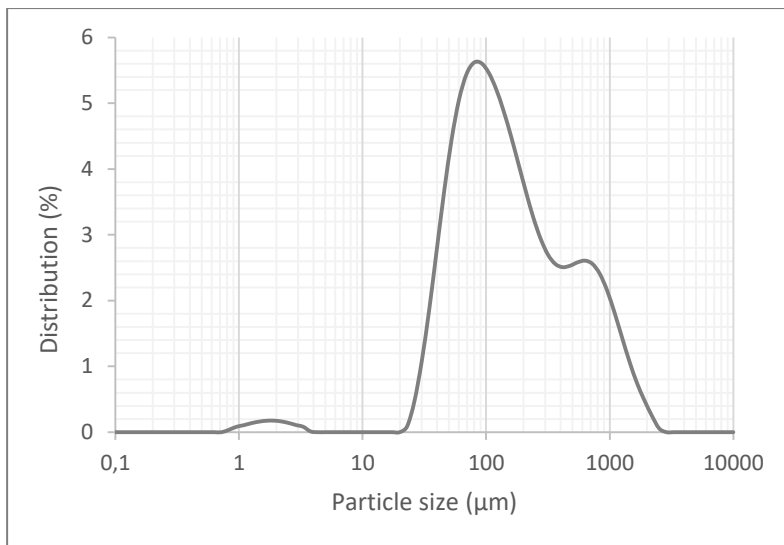
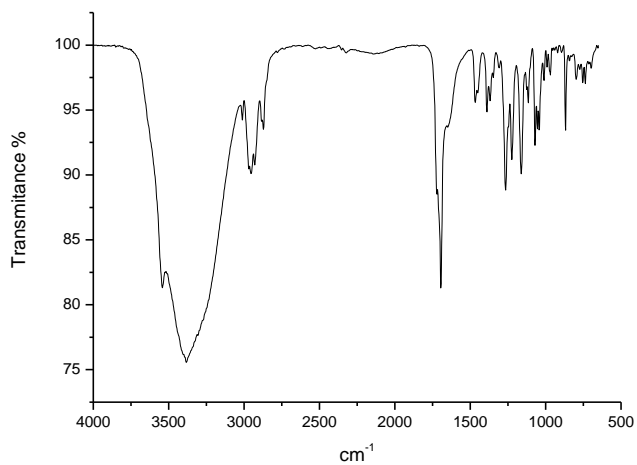
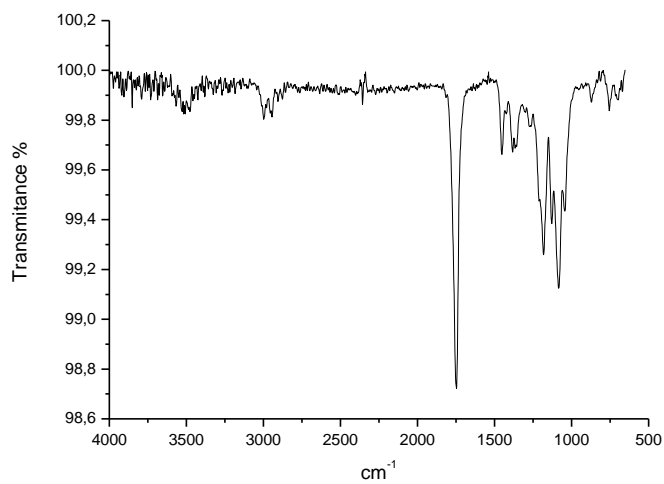
Figura 2: Tamanho das microesferas**Figura 2- Análise da distribuição do tamanho das microesferas.**

Figura 3: FT-IR

(a)



(b)



(c)

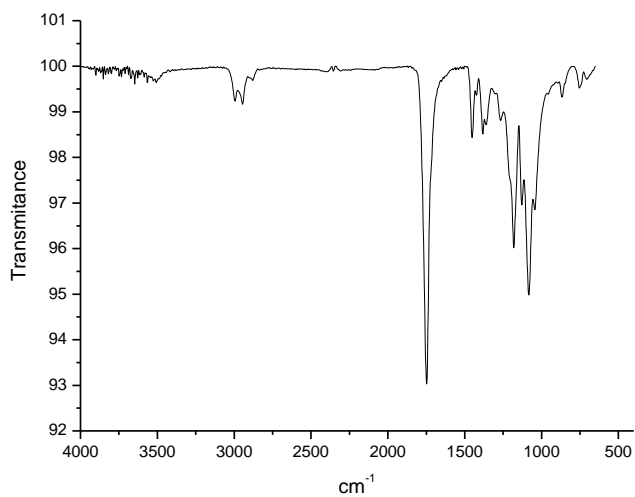
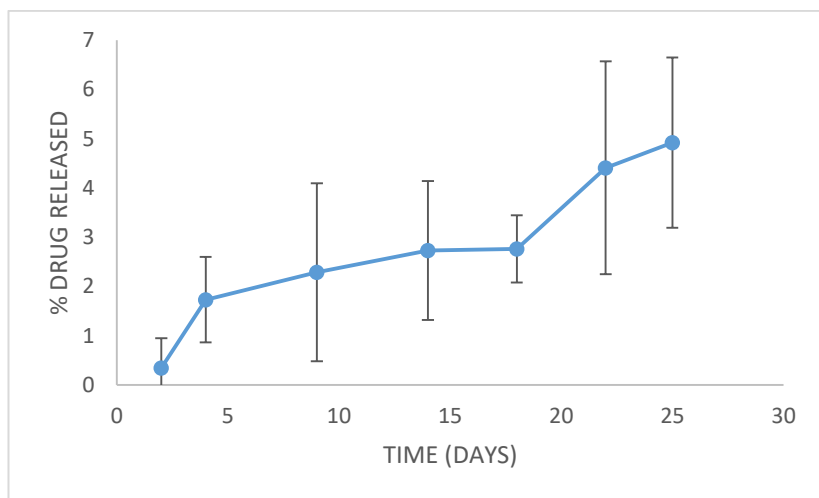


Figura 3- Espectro de FT-IR da sinvastatina (a), PLGA (b) e das microesferas de PLGA com sinvastatina (c).

Figura 4: Liberação *In Vitro* da Sinvastatina**Figura 4- Perfil de liberação da SIN no período de 25 dias em PBS.**